

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年1 月8 日 (08.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/003197 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, 1/19, C12P 21/02

〒062-8517 北海道 札幌市豊平区 月寒東 2 条 1 7 丁
目 2 番 1 号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海
道センター内 Hokkaido (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/005956

(22) 国際出願日: 2003 年5 月13 日 (13.05.2003)

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都港区 虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5
森ビル 3階 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(30) 優先権データ:
特願2002-191383 2002 年6 月28 日 (28.06.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立
行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTI-
TUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND
TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都 千代田区
霞が関一丁目3 番1 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐原 健彦 (SA-
HARA, Takehiko) [JP/JP]; 〒062-8517 北海道 札幌市豊
平区 月寒東 2 条 1 7 丁目 2 番 1 号 独立行政法人産業
技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 扇
谷 悟 (OHGIYA, Satoru) [JP/JP]; 〒062-8517 北海道 札
幌市豊平区 月寒東 2 条 1 7 丁目 2 番 1 号 独立行政
法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido
(JP). 合田 孝子 (GODA, Takako) [JP/JP]; 〒062-8517 北
海道 札幌市豊平区 月寒東 2 条 1 7 丁目 2 番 1 号 独
立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内
Hokkaido (JP). 川崎 公誠 (KAWASAKI, Kosei) [JP/JP];

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: YEAST-ORIGIN PROMOTER AND VECTOR AND EXPRESSION SYSTEM USING THE SAME

(54) 発明の名称: 酵母由来プロモーターならびにこれを用いたベクターおよび発現系

(57) Abstract: A DNA fragment having a cold-inducible promoter activity of a yeast and showing an elevated activity in a low temperature region is provided by identifying a DNA fragment which occurs in the nontranslational region in the 5' -upstream side of a gene selected from the group consisting of cold-inducible genes of *Saccharomyces cerevisiae* and has the function of a cold-inducible promoter.

(57) 要約: サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)の低温誘導性遺伝子からなる群から選ばれる1つの遺伝子の5'上流側の非翻訳領域に存在し、低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片を同定することにより、低温域においてより高い活性を有する酵母の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片を提供する。

Best Available Copy

明 細 書

酵母由来プロモーターならびにこれを用いたベクターおよび発現系

技術分野

本発明は、酵母の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片に関する。

背景技術

酵母は、ビール、日本酒などのアルコール飲料やパンなどの発酵を利用した食品などの製造に用いられる他、アミノ酸などの代謝産物の製造、さらには組換えDNA技術を利用して同種あるいは他種生物のタンパク質生産の宿主として広く用いられている。組換えDNA技術によるタンパク質生産における酵母の特長は、従来食品産業に用いられてきた実績から推定される生物としての安全性、大腸菌などの原核生物とは異なり真核生物であることからヒトなどの動物のタンパク質の発現に成功する確率が比較的高いこと、また、遺伝子組換え技術が非常によく整備されていることにある。

一般にビール製造あるいは吟醸酒製造においては、10℃以下などの低温で発酵させることにより香りや味が洗練され、食品としての品質が向上することが既に知られている。この香りや味の向上にはそれらを与える化学物質の存在が推定されることから、温度が低下することによって、化学物質を合成する酵素の遺伝子の働きが適切に制御されたと考えられる。しかしながら、低温で働く酵母の遺伝子については限られた情報しかなく、どのような遺伝子が働くことが食品の香りや味の向上に重要なのかは未だ不明である。

一方、酵母や大腸菌を宿主とした遺伝子組換え技術においては、タンパク質生産のために、従来通常の培養温度（酵母で30℃、大腸菌で37℃）において働くプロモーターが用いられてきた。一般により多くのmRNAを生産する強力なプロモーターが使われている。低温で培養することは遺伝子組換え技術によるタンパク質生産においては不利になると思われるが、実際には意図的に低温を利用して

タンパク質の生産を行う場合がある。例えば、通常の温度で生産されたタンパク質が正しい立体構造を形成しない場合であり、この場合には低温で生産することにより正しい立体構造を有したタンパク質が生産されることがあり、これを期待して培養温度を通常より10℃程低めにしてタンパク質生産を行うことがある (Prot. Exp. Purif. 2, 432-441 (1991))。また、生産されたタンパク質が宿主のプロテアーゼによって分解されることを抑えるという効果も期待される。このように低温においてタンパク質を生産させることにはメリットがあると考えられるが、一方で現在用いられている常温型プロモーターは温度の低下に応じてそのプロモーター活性も低下すると考えられる。したがって、効率的な低温でのタンパク質生産システムを確立するには、低温域において高い活性を示すプロモーターを用いることが適切である。

これまでに、YBR067C (TIP1)、YER011W (TIR1)、YGR159C (NSR1)、YGL055W (OLE1)、YOR010C (TIR2)、YKL060C (FBA1)、YIL018W (RPL2B)、YDL014W (NOP1)、YKL183W、YKL011WおよびYDR299W (BFR2)のそれぞれのmRNAが酵母を低温処理することによって増加することが報告されているが、それぞれの遺伝子のプロモーターがどの程度強い低温誘導性を示すのかは精査されていない。

発明の開示

本発明は、酵母の低温誘導性遺伝子をより多く同定、分析することにより、例えば低温域（例えば10℃以下）においてより高い活性を有する酵母の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片を提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、DNAマイクロアレイを用いて、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の低温誘導性を示す遺伝子を同定し、それぞれの遺伝子の5' 上流側の非翻訳領域に低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片を見出すことで、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下の表1に記載されるサッカロミセス・セレビシエの遺伝子からなる群から選ばれる1つの遺伝子の5' 上流側の非翻訳領域に存在し、低

温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片である。

表 1

番号	系統的 遺伝子 名	番号	系統的 遺伝子 名	番号	系統的 遺伝子 名	番号	系統的 遺伝子 名	番号	系統的 遺伝子 名
1	YAL014C	53	YDR184C	105	YGR008C	157	YKL224C	209	YNR071C
2	YAL015C	54	YDR219C	106	YGR043C	158	YKR049C	210	YNR075W
3	YAL025C	55	YDR253C	107	YGR053C	159	YKR075C	211	YNR076W
4	YAL034C	56	YDR256C	108	YGR088W	160	YKR077W	212	YOL002C
5	YBL048W	57	YDR262W	109	YGR102C	161	YKR100C	213	YOL016C
6	YBL049W	58	YDR306C	110	YGR154C	162	YLL055W	214	YOL084W
7	YBL054W	59	YDR336W	111	YGR197C	163	YLL056C	215	YOL101C
8	YBL056W	60	YDR346C	112	YGR222W	164	YLR009W	216	YOL108C
9	YBL065W	61	YDR387C	113	YGR223C	165	YLR145W	217	YOL116W
10	YBL078C	62	YDR398W	114	YGR251W	166	YLR149C	218	YOL124C
11	YBR016W	63	YDR435C	115	YGR256W	167	YLR164W	219	YOL127W
12	YBR018C	64	YDR453C	116	YGR262C	168	YLR251W	220	YOL132W
13	YBR024W	65	YDR471W	117	YGR286C	169	YLR252W	221	YOL153C
14	YBR034C	66	YDR492W	118	YGR294W	170	YLR266C	222	YOL154W
15	YBR045C	67	YDR496C	119	YHL016C	171	YLR311C	223	YOL161C
16	YBR047W	68	YDR504C	120	YHL021C	172	YLR312C	224	YOL162W
17	YBR050C	69	YDR516C	121	YHL036W	173	YLR327C	225	YOL163W
18	YBR072W	70	YDR530C	122	YHL046C	174	YLR413W	226	YOL165C
19	YBR116C	71	YDR542W	123	YHR066W	175	YLR421C	227	YOR019W
20	YBR117C	72	YEL011W	124	YHR087W	176	YML004C	228	YOR031W
21	YBR126C	73	YEL039C	125	YHR138C	177	YML128C	229	YOR043W
22	YBR148W	74	YEL072W	126	YHR139C	178	YML131W	230	YOR095C
23	YBR199W	75	YER020W	127	YHR141C	179	YMR030W	231	YOR292C
24	YBR223C	76	YER042W	128	YHR146W	180	YMR090W	232	YOR298W
25	YBR296C	77	YER053C	129	YIL036W	181	YMR100W	233	YOR391C
26	YBR297W	78	YER056C	130	YIL045W	182	YMR105C	234	YOR394W
27	YBR298C	79	YER065C	131	YIL069C	183	YMR107W	235	YPL004C
28	YBR301W	80	YER066W	132	YIL077C	184	YMR139W	236	YPL014W
29	YCL051W	81	YER067W	133	YIL107C	185	YMR246W	237	YPL015C
30	YCR005C	82	YER078C	134	YIL136W	186	YMR255W	238	YPL043W
31	YCR072C	83	YER079W	135	YIL143C	187	YMR258C	239	YPL054W
32	YCR107W	84	YER117W	136	YIL153W	188	YMR262W	240	YPL093W
33	YDL022W	85	YER150W	137	YJL132W	189	YMR271C	241	YPL107W
34	YDL024C	86	YFL014W	138	YJL155C	190	YMR316W	242	YPL122C
35	YDL031W	87	YFL030W	139	YJL223C	191	YMR320W	243	YPL149W

36	YDL037C	88	YFL055W	140	YJR085C	192	YMR322C	244	YPL171C
37	YDL039C	89	YFL056C	141	YJR155W	193	YNL011C	245	YPL186C
38	YDL059C	90	YFL057C	142	YKL026C	194	YNL024C	246	YPL223C
39	YDL070W	91	YFR014C	143	YKL070W	195	YNL112W	247	YPL224C
40	YDL075W	92	YFR015C	144	YKL071W	196	YNL117W	248	YPL245W
41	YDL113C	93	YFR017C	145	YKL078W	197	YNL124W	249	YPL250C
42	YDL115C	94	YFR053C	146	YKL087C	198	YNL141W	250	YPL280W
43	YDL125C	95	YGL029W	147	YKL089W	199	YNL142W	251	YPL281C
44	YDL169C	96	YGL033W	148	YKL090W	200	YNL178W	252	YPL282C
45	YDL204W	97	YGL045W	149	YKL091C	201	YNL194C	253	YPR045C
46	YDL243C	98	YGL075C	150	YKL094W	202	YNL195C	254	YPR061C
47	YDR003W	99	YGL122C	151	YKL103C	203	YNL213C	255	YPR086W
48	YDR018C	100	YGL135W	152	YKL125W	204	YNL244C	256	YPR121W
49	YDR056C	101	YGL179C	153	YKL150W	205	YNL331C	257	YPR143W
50	YDR070C	102	YGL184C	154	YKL151C	206	YNR039C	258	YPR160W
51	YDR111C	103	YGL255W	155	YKL162C	207	YNR051C	259	YPR200C
52	YDR174W	104	YGL261C	156	YKL187C	208	YNR053C		

また本発明は、以下の(a)又は(b)のDNAを含む、低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片である。

(a) 表1に記載されるサッカロミセス・セレビシエの遺伝子からなる群から選ばれる1つの遺伝子の5'上流側の非翻訳領域に存在し、低温誘導性プロモーター機能を有するDNA断片において1若しくは複数の塩基が欠失、置換若しくは付加されたDNA

(b) 表1に記載されるサッカロミセス・セレビシエの遺伝子からなる群から選ばれる1つの遺伝子の5'上流側の非翻訳領域に存在し、低温誘導性プロモーター機能を有するDNA断片に相補的な塩基配列からなるDNA断片とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

さらに本発明は、以下の(a)及び/又は(b)のシス配列を含み、低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片である。

(a) DNA配列A : G C T C A T C G

(b) DNA配列B : G A G A T G A G

また本発明は、以下の(a)又は(b)のDNAを含む、低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片である。

(a) 前記シス配列を含み、低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片において1若しくは複数の塩基が欠失、置換若しくは付加されたDNA

(b) 前記シス配列を含み、低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片に相補的な塩基配列からなるDNA断片とストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA

さらに、本発明は、上記DNA断片を含む発現ベクターあるいは該発現ベクターにおいて上記DNA断片の下流に外来遺伝子又は外来DNA断片を含むことを特徴とする発現ベクターである。

さらに、本発明は、前記発現ベクターによって形質転換された形質転換体である。宿主としては、酵母が挙げられる。

さらに、本発明は、前記形質転換体を培養温度を低下させて培養することの特徴とするタンパク質の製造方法又はRNA生産制御方法である。培養温度としては10℃以下が挙げられる。

以下、本発明を詳細に説明する。本願は、2002年6月28日に出願された日本国特許出願第2002-191383号の優先権を主張するものであり、上記特許出願の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

酵母の低温誘導性遺伝子を同定することで、本発明に係る酵母の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片を同定できる。酵母の至適培養温度である30℃から10℃に培養温度を低下させた際にmRNA量が増加する遺伝子を、低温誘導性遺伝子として同定する。これらの低温誘導性遺伝子を網羅的に捕捉するために、サッカロミセス・セレビシエに由来する全遺伝子(約6200個)において増幅等の理由から調製が困難であった遺伝子を除くおよそ5800個の遺伝子に由来するcDNAをスライドガラスに固定したDNAマイクロアレイ(DNAチップ研究所製)を用いることができる。DNAマイクロアレイに作用させるRNAサンプルとしては、サッカロミセス・セレビシエの培養温度を30℃から10℃に低下させた後に経時的に菌体を回収し、回収した菌体からRNAを抽出することで調製した複数のRNAサンプルを使用することができる。このように調製した複数のサンプルを用いることで、サッカロミセス・セレビシエの培養温度を低温にシフトした直後に発現量が増加する遺

伝子及び徐々に発現量が増加する遺伝子を同定することができる。これらのRNAサンプルを用いてDNAマイクロアレイに固定された個々の遺伝子について、mRNA量を低温処理前後で比較する。その結果、低温処理前のmRNA量と比較して、低温処理後のmRNA量が増加した遺伝子を、低温誘導性遺伝子として特定することができる。例えば、低温処理前のmRNA量と比較して、低温処理後のmRNA量が3倍以上に増加した遺伝子を、低温誘導性遺伝子として同定することができる。このようにして同定された低温誘導性遺伝子としては新規な遺伝子259個を下記の表2に示す。

表 2

番号	系統的 遺伝子 名	番号	系統的 遺伝子 名	番号	系統的 遺伝子 名	番号	系統的 遺伝子 名	番号	系統的 遺伝子 名
1	YAL014C	53	YDR184C	105	YGR008C	157	YKL224C	209	YNR071C
2	YAL015C	54	YDR219C	106	YGR043C	158	YKR049C	210	YNR075W
3	YAL025C	55	YDR253C	107	YGR053C	159	YKR075C	211	YNR076W
4	YAL034C	56	YDR256C	108	YGR088W	160	YKR077W	212	YOL002C
5	YBL048W	57	YDR262W	109	YGR102C	161	YKR100C	213	YOL016C
6	YBL049W	58	YDR306C	110	YGR154C	162	YLL055W	214	YOL084W
7	YBL054W	59	YDR336W	111	YGR197C	163	YLL056C	215	YOL101C
8	YBL056W	60	YDR346C	112	YGR222W	164	YLR009W	216	YOL108C
9	YBL065W	61	YDR387C	113	YGR223C	165	YLR145W	217	YOL116W
10	YBL078C	62	YDR398W	114	YGR251W	166	YLR149C	218	YOL124C
11	YBR016W	63	YDR435C	115	YGR256W	167	YLR164W	219	YOL127W
12	YBR018C	64	YDR453C	116	YGR262C	168	YLR251W	220	YOL132W
13	YBR024W	65	YDR471W	117	YGR286C	169	YLR252W	221	YOL153C
14	YBR034C	66	YDR492W	118	YGR294W	170	YLR266C	222	YOL154W
15	YBR045C	67	YDR496C	119	YHL016C	171	YLR311C	223	YOL161C
16	YBR047W	68	YDR504C	120	YHL021C	172	YLR312C	224	YOL162W
17	YBR050C	69	YDR516C	121	YHL036W	173	YLR327C	225	YOL163W
18	YBR072W	70	YDR530C	122	YHL046C	174	YLR413W	226	YOL165C
19	YBR116C	71	YDR542W	123	YHR066W	175	YLR421C	227	YOR019W
20	YBR117C	72	YEL011W	124	YHR087W	176	YML004C	228	YOR031W
21	YBR126C	73	YEL039C	125	YHR138C	177	YML128C	229	YOR043W
22	YBR148W	74	YEL072W	126	YHR139C	178	YML131W	230	YOR095C
23	YBR199W	75	YER020W	127	YHR141C	179	YMR030W	231	YOR292C
24	YBR223C	76	YER042W	128	YHR146W	180	YMR090W	232	YOR298W
25	YBR296C	77	YER053C	129	YIL036W	181	YMR100W	233	YOR391C

26	YBR297W	78	YER056C	130	YIL045W	182	YMR105C	234	YOR394W
27	YBR298C	79	YER065C	131	YIL069C	183	YMR107W	235	YPL004C
28	YBR301W	80	YER066W	132	YIL077C	184	YMR139W	236	YPL014W
29	YCL051W	81	YER067W	133	YIL107C	185	YMR246W	237	YPL015C
30	YCR005C	82	YER078C	134	YIL136W	186	YMR255W	238	YPL043W
31	YCR072C	83	YER079W	135	YIL143C	187	YMR258C	239	YPL054W
32	YCR107W	84	YER117W	136	YIL153W	188	YMR262W	240	YPL093W
33	YDL022W	85	YER150W	137	YJL132W	189	YMR271C	241	YPL107W
34	YDL024C	86	YFL014W	138	YJL155C	190	YMR316W	242	YPL122C
35	YDL031W	87	YFL030W	139	YJL223C	191	YMR320W	243	YPL149W
36	YDL037C	88	YFL055W	140	YJR085C	192	YMR322C	244	YPL171C
37	YDL039C	89	YFL056C	141	YJR155W	193	YNL011C	245	YPL186C
38	YDL059C	90	YFL057C	142	YKL026C	194	YNL024C	246	YPL223C
39	YDL070W	91	YFR014C	143	YKL070W	195	YNL112W	247	YPL224C
40	YDL075W	92	YFR015C	144	YKL071W	196	YNL117W	248	YPL245W
41	YDL113C	93	YFR017C	145	YKL078W	197	YNL124W	249	YPL250C
42	YDL115C	94	YFR053C	146	YKL087C	198	YNL141W	250	YPL280W
43	YDL125C	95	YGL029W	147	YKL089W	199	YNL142W	251	YPL281C
44	YDL169C	96	YGL033W	148	YKL090W	200	YNL178W	252	YPL282C
45	YDL204W	97	YGL045W	149	YKL091C	201	YNL194C	253	YPR045C
46	YDL243C	98	YGL075C	150	YKL094W	202	YNL195C	254	YPR061C
47	YDR003W	99	YGL122C	151	YKL103C	203	YNL213C	255	YPR086W
48	YDR018C	100	YGL135W	152	YKL125W	204	YNL244C	256	YPR121W
49	YDR056C	101	YGL179C	153	YKL150W	205	YNL331C	257	YPR143W
50	YDR070C	102	YGL184C	154	YKL151C	206	YNR039C	258	YPR160W
51	YDR111C	103	YGL255W	155	YKL162C	207	YNR051C	259	YPR200C
52	YDR174W	104	YGL261C	156	YKL187C	208	YNR053C		

本発明に係るDNA断片は、上記の表2に記載されたサッカロミセス・セレビシエの遺伝子のなかから選ばれる遺伝子の5'上流側の非翻訳領域に存在し、低温誘導性プロモーターとして機能するものである。

表2は、259個の遺伝子にそれぞれ付与された1～259番までの番号と、系統的遺伝子名とを関連付けて表示している。この系統的遺伝子名は、酵母ゲノムデータベース (Saccharomyces cerevisiae genome database; <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>) にsystematic nameとして登録されている表記と一致している。したがって、表2に記載されたサッカロミセス・セレビシエの遺伝子は、系統的遺伝子名をキーとして酵母ゲノムデータベースにおけるsystematic n

ameを検索することによって容易に特定することができる。また、表2に記載されたサッカロミセス・セレビシエの遺伝子に関する塩基配列は、酵母ゲノムデータベースを検索することによって得ることができる。さらに、表2に記載されたサッカロミセス・セレビシエの遺伝子に関するその他の情報も、酵母ゲノムデータベースを検索することによって得ることができる。

低温誘導性プロモーターとは、酵母の至適培養温度におけるプロモーター活性と比較して、酵母の至適培養温度よりも低い温度で高いプロモーター活性を示すプロモーターを意味する。具体的に、低温誘導性プロモーターは、酵母の至適培養温度におけるプロモーター活性と比較して、酵母の至適培養温度よりも低い温度で3倍以上のプロモーター活性を示す。ここで、酵母の至適培養温度は、約30℃である。また、酵母の至適培養温度よりも低い温度とは、30℃未満の温度、例えば約10℃を意味するが、20℃以下、好ましくは15℃以下の温度であればこの温度に限定されない。

プロモーター活性は、定法に従って測定することができる。例えば、プロモーターの下流に発現可能にレポーター遺伝子を連結した発現ベクターを構築する。次に、発現ベクターで適当な宿主（例えば、酵母）を形質転換する。得られた形質転換体を所定の条件下で培養し、レポーター遺伝子の発現量をmRNAレベル或いはタンパク質レベルで定量することによって、当該条件下におけるプロモーター活性を測定することができる。

また、5'上流側の非翻訳領域とは、上述したように特定された遺伝子のコーディング鎖における5'末端側に存在し、且つ、タンパク質へ翻訳されない領域を意味する。言い換えれば、非翻訳領域とは、いわゆるORF (open reading frame) に含まれない領域を意味する。

所定の遺伝子（以下、対象遺伝子と呼ぶ）の5'上流側の非翻訳領域は、酵母ゲノムデータベースを用いて具体的に特定することができる。すなわち、まず、対象遺伝子の系統的遺伝子名をキーとして酵母ゲノムデータベースを検索する。次に、検索の結果として対象遺伝子に関する各種情報が得られ、この各種情報の中から対象遺伝子の染色体上の位置を特定する。次に、対象遺伝子の染色体上の位

置に基づいて、酵母ゲノムデータベースに登録された染色体地図から、対象遺伝子の5'上流側に位置する遺伝子（5'上流隣接遺伝子と呼ぶ）を特定する。このように特定された対象遺伝子及び5'上流隣接遺伝子に挟まれる領域は、タンパク質へ翻訳されない領域であり、ORFを含まない領域である。すなわち、以上の工程によって、対象遺伝子及び5'上流隣接遺伝子に挟まれる領域を、対象遺伝子の5'上流側の非翻訳領域として特定することができる。

このように特定された対象遺伝子の5'上流側の非翻訳領域に関する塩基配列は、酵母ゲノムデータベースに登録された酵母ゲノム全塩基配列情報を検索することによって得ることができる。また、特定された対象遺伝子の5'上流側の非翻訳領域は、20塩基程度の該領域の両端の塩基配列に相補的なプライマーを用い、酵母から抽出したゲノムを鋳型としたPCRによって容易に得ることができる。

本発明に係るDNA断片は、5'上流側の非翻訳領域の全部であっても良いし、低温誘導性プロモーターとしての機能を示す限り、5'上流側の非翻訳領域の一部であっても良い。

さらに本発明に係るDNA断片は、上記DNA断片において1又は数個（例えば1～10個、1～5個）の塩基が欠失、置換若しくは付加されたDNAを含み、かつ低温誘導性プロモーターの機能を有するものであっても良い。

さらに上記DNA断片に相補的な塩基配列からなるDNA断片とストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAを含み、かつ低温誘導性プロモーターの機能を有するものも本発明に係るDNA断片に含まれる。

ここで、ストリンジントな条件とは、例えばリン32で標識したプローブDNAを用いる場合には、5 X SSC(0.75M NaCl、0.75Mクエン酸ナトリウム)、5 X デンハルト試薬(0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ウシ血清アルブミン)および0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)からなるハイブリダイゼーション溶液中で、温度が45℃～65℃、好ましくは55℃～65℃である。また洗浄ステップにおいては、2 X SSCおよび0.1%SDSからなる洗浄溶液中で温度が45℃～55℃、より好ましくは0.1 X SSCおよび0.1%SDSからなる洗浄溶液中で温度が45℃～55℃である。AlkPhos direct labeling module(アマシャムバイオテック)のキット

を用いて酵素標識したプローブDNAを用いる場合には、該キットのマニュアルに記載されている組成のハイブリダイゼーション溶液(0.5M NaClおよび4%ブロッキング試薬を含む)中で温度が55℃～75℃である。また洗浄ステップにおいては、該キットのマニュアルに記載されている一次洗浄液(2M 尿素を含む)中で55℃～75℃、かつ二次洗浄液中で室温である。また、他の検出法であってもよく、その場合にはその検出法の標準的な条件であってよい。

一方、本発明に係るDNA断片は、以下の(a)及び/又は(b)のDNAを含み、且つ低温誘導性プロモーターとして機能するものであっても良い。

(a) DNA配列A : G C T C A T C G

(b) DNA配列B : G A G A T G A G

これら(a)及び(b)のDNAは、上記のDNAマイクロアレイおよび方法を用いて初期に低温誘導性を示す遺伝子の5'上流側の非翻訳領域に共通する配列(シス配列と呼ぶ)である。例えば、まず初期に低温誘導性を示す遺伝子を、10℃に培養温度を低下させてから15分後にシグナルが2倍以上に上がった遺伝子として同定することができる。同定された41個の遺伝子を下記の表3に示す。

表 3

番号	系統的 遺伝子名	番号	系統的 遺伝子名
1	YDL039C	22	YDL063C
2	YNL141W	23	YOR360C
3	YDL037C	24	YHR196W
4	YKR075C	25	YNL065W
5	YER056C	26	YHR066W
6	YOL124C	27	YLR407W
7	YDR492W	28	YOR101W
8	YLR413W	29	YNL112W
9	YCR072C	30	YGR159C
10	YOR095C	31	YGL055W
11	YNL175C	32	YNR053C
12	YDR398W	33	YPL093W
13	YGR283C	34	YHR170W
14	YBR296C	35	YHR148W
15	YDR184C	36	YBR034C
16	YOR338W	37	YOL010W

17	YAL025C	38	YKL078W
18	YOR063W	39	YMR290C
19	YIL096C	40	YDR101C
20	YER127W	41	YBL054W
21	YBL042C		

表3は、41個の遺伝子にそれぞれ付与された1～41番までの番号と、系統的遺伝子名とを関連付けて表示している。なお系統的遺伝子名は、表2と同様に上記の酵母ゲノムデータベースにsystematic nameとして登録されている表記と一致している。

次いでGene Spring(Silicon Genetics社)を用いて、これらの各々の遺伝子のORFから600bp上流までの間に存在するシス配列を検索する。その結果、これらの遺伝子の一部に共通して存在するDNA配列として得ることができる。具体的には、上記のDNA配列AがYNL112W、YGR159C、YGL055W、YNR053C、YPL093W、YHR170WおよびYHR148W(表3の番号29～35に対応する)に共通して存在するシス配列として、またDNA配列BがYBR034C、YOL010W、YKL078W、YMR290C、YDR101CおよびYBL054W(表3の番号36～41に対応する)に共通して存在するシス配列として見出すことができる。

さらに上記DNA断片は、上記DNA断片において1又は数個(例えば1～3個)の塩基が欠失、置換若しくは付加されたDNAを含み、かつ低温誘導性プロモーターの機能を有するものであっても良い。

さらに上記DNA断片に相補的な塩基配列からなるDNA断片とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを含み、かつ低温誘導性プロモーターの機能を有するものも本発明に係るDNA断片に含まれる。

ここで、ストリンジェントな条件とは、例えばリン32で標識したプローブDNAを用いる場合には、5 X SSC(0.75M NaCl、0.75Mクエン酸ナトリウム)、5 X デンハルト試薬(0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ウシ血清アルブミン)および0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)からなるハイブリダイゼーション溶液中で、温度が45℃～65℃、好ましくは55℃～65℃である。また洗浄ステップにおいては、2 X SSCおよび0.1%SDSからなる洗浄溶液中で温度が45℃～55

℃、より好ましくは0.1 X SSCおよび0.1% SDSからなる洗浄溶液中で温度が45℃～55℃である。AlkPhos direct labeling module (アマシヤムバイオテック)のキットを用いて酵素標識したプローブDNAを用いる場合には、該キットのマニュアルに記載されている組成のハイブリダイゼーション溶液(0.5M NaClおよび4%ブロッキング試薬を含む)中で温度が55℃～75℃である。また洗浄ステップにおいては、該キットのマニュアルに記載されている一次洗浄液(2M 尿素を含む)中で55℃～75℃、かつ二次洗浄液中で室温である。また、他の検出法であってもよく、その場合にはその検出法の標準的な条件であってよい。

一旦本発明に係るDNA断片の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又はクローニングされたプローブを鋳型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることによって本発明に係るDNA断片を得ることができる。さらに、部位特異的突然変異誘発法等によって本発明に係るDNA断片の変異型であって変異前と同等の機能を有するものを合成することができる。

なお、本発明に係るDNA断片に変異を導入するには、Kunkel法、Gapped duplex 法等の公知の手法又はこれに準ずる方法を採用することができる。例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット(例えばMutant-K(TAKARA社製)やMutant-G(TAKARA社製))などを用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて変異の導入が行われる。

本発明に係る発現ベクターは、適当なベクターに本発明に係るDNA断片を挿入することにより得ることができる。本発明に係るDNA断片を挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えばプラスミド、シャトルベクター、ヘルパープラスミドなどが挙げられる。また該ベクター自体に複製能がない場合には、宿主の染色体に挿入することなどによって複製可能となるDNA断片であってもよい。

プラスミド DNAとしては、大腸菌由来のプラスミド(例えばpBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19、pBluescript等)、枯草菌由来のプラスミド(例えばpUB110、pTP5等)、酵母由来のプラスミド(例えばYEp13などのYEp系、YCp50な

どのYCp系等)などが挙げられ、ファージDNAとしてはλファージ (Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、λgt10、λgt11、λZAP等)が挙げられる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

ベクターに本発明に係るDNA断片を挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。またベクターと本発明に係るDNA断片のそれぞれ一部に相同な領域を持たせることにより、PCRなどを用いたin vitro法または酵母などを用いたin vivo法によって両者を連結する方法であってもよい。

本発明に係る発現ベクターは、本発明に係るDNA断片の下流にさらに外来遺伝子又は外来DNA断片を挿入することができる。外来遺伝子又は外来DNA断片を挿入する方法は、ベクターに本発明に係るDNA断片を挿入する方法と同様である。

本発明に係る発現ベクターにおいて、本発明に係るDNA断片の下流に置かれる外来遺伝子としては、いかなるタンパク質、ペプチドであっても良いが、特に低温生産に適しているタンパク質が例として挙げられる。より具体的には、低温において機能する不凍タンパク質、熱に不安定で変性しやすい低温活性酵素、蛍光タンパク質GFPなどが挙げられる。さらに本発明に係るDNA断片の下流に置かれる外来DNA断片としては、RNA自体が機能するアンチセンスRNA又はリボザイムなどが挙げられる。

本発明に係る形質転換体は、本発明に係る発現ベクターを宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、プロモーター及び外来遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではないが、本発明における宿主としては酵母が挙げられる。また酵母としては、例えばサッカロミセス・セレビシエ、実験酵母、醸造用酵母、食用酵母および工業用酵母などが挙げられる。

酵母への本発明に係る発現ベクターの導入方法は、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えば電気穿孔法(エレクトロポレーション法)、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等が挙げられる。また、YIp系などのベクターある

いは染色体中の任意の領域と相同なDNA配列を用いた染色体への置換・挿入型の酵母の形質転換法であっても良い。さらに酵母細胞への本発明に係る発現ベクターの導入方法は、一般的実験書または学術論文などに記載されたいかなる方法によってもよい。

本発明に係る発現ベクターを、上記酵母宿主に導入するのみならず、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等のエッシェリヒア属、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属、又はシュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 等のシュードモナス属等に属する細菌、COS細胞等の動物細胞、Sf9等の昆虫細胞、あるいはアブラナ科等に属する植物などに導入して形質転換体を得ることもできる。細菌を宿主とする場合は、本発明に係る発現ベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、本発明に係るDNA断片、リボソーム結合配列、目的遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

細菌への本発明に係る発現ベクターの導入方法は、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法およびエレクトロポレーション法等が挙げられる。

動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞)、マウスL細胞などが用いられる。動物細胞への本発明に係る発現ベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9細胞などが用いられる。昆虫細胞への本発明に係る発現ベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法およびエレクトロポレーション法等が挙げられる。

植物を宿主とする場合は、植物体全体、植物器官 (例えば葉、花卉、茎、根、種子等)、植物組織 (例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等) 又は植物培養細胞などが用いられる。植物への本発明に係る発現ベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法およびPEG法等が挙げられる。

遺伝子が宿主に組み込まれたか否かの確認は、PCR法、サザンハイブリダイゼーション法およびノーザンハイブリダイゼーション法等により行うことができる。例えば、形質転換体からDNAを調製し、DNA特異的プライマーを設計してPCRを行う。その後は、増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はキャピラリー電気泳動等を行い、臭化エチジウム、SYBR Green液等により染色し、そして増幅産物を1本のバンドとして検出することにより、形質転換されたことを確認する。また、予め蛍光色素等により標識したプライマーを用いてPCRを行い、増幅産物を検出することもできる。さらに、マイクロプレート等の固相に増幅産物を結合させ、蛍光又は酵素反応等により増幅産物を確認する方法も採用してもよい。

本発明に係るタンパク質の製造方法は、本発明に係るDNA断片及び本発明に係るDNA断片の下流に外来遺伝子を連結した発現ベクターを宿主に導入することによって形質転換体を作製し、該形質転換体を培養温度を低下させて培養することにより下流にある外来遺伝子にコードされたタンパク質を生産する方法である。培養温度としては例えば10℃以下が挙げられる。例えば、低温域に棲息する生物が有する低温活性酵素および不凍タンパク質などの中には、熱に非常に不安定であるために常温で生産することにより変性してしまう場合がある。このような場合において、本発明に係る低温誘導性プロモーターの下流に上記低温活性酵素又は不凍タンパク質をコードする遺伝子を連結した発現ベクターを酵母に導入し、その系の温度を酵母の至適培養温度約30℃から低温（例えば10℃）に低下させることにより、本発明に係るDNA断片の下流の遺伝子に対するmRNAを増加させることができ、活性型タンパク質の効率的な発現系を構築することが可能となる。

さらにタンパク質分解酵素のように、生産するタンパク質（酵素）が細胞障害性を示す場合においては、組換え体の成長を阻害するために生産することが非常に困難である。この場合、本発明に係るタンパク質の製造方法を用いることで、まず至適培養温度（約30℃）において外来遺伝子産物の生産量を抑えつつ組換え体を増殖させ、十分に菌体を得られた時点で温度を低下させることによって、細胞毒性を抑えつつ誘導生産することが可能となる。また、近年細胞内タンパク質の

動態解析やバイオモニタリングのために繁用される蛍光タンパク質GFPにおいては、組換え体内で生産された際に、蛍光を発するタンパク質構造に変化するために成熟過程を必要とすることが知られている。この成熟過程が低温において促進されると考えられており、実際通常の培養温度よりも低温で生産させることにより、より高い蛍光が得られる（松崎ら、実験医学別冊ポストゲノム時代の実験講座3「GFPとバイオイメージング」羊土社（2000）pp. 31-37）。したがって本発明に係るタンパク質の製造方法によって、より高感度にGFPを利用したバイオモニタリングを行うことが可能となる。

また本発明に係るRNA生産制御方法は、本発明に係るDNA断片及び本発明に係るDNA断片の下流に外来DNA断片を連結した後、宿主に導入することによって形質転換体を作製し、該形質転換体を培養温度を低下させて培養することにより下流にある外来DNA断片によってRNA生産を制御する方法である。培養温度としては10℃以下が挙げられる。例えば本発明に係る低温誘導性プロモーターの下流に特定の遺伝子に対するアンチセンスRNAをコードする遺伝子を連結した発現ベクターを酵母に導入し、その系の温度を酵母の至適培養温度約30℃から低温（例えば10℃）に低下させることにより、本発明に係るDNA断片の下流の遺伝子に対応するアンチセンスRNAの含量を増加させることで、特定の遺伝子の発現を制御することが可能となる。

図面の簡単な説明

図1は、培養温度を30℃から10℃に低下させた時のHSP12 mRNA量の変化を示すノーザンブロット分析の結果である。上部に低温処理後の培養時間を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

図2は、培養温度を30℃から10℃に低下させた時のDBP2 mRNA量の変化を示すノーザンブロット分析の結果である。上部に低温処理後の培養時間を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

図3は、培養温度を30℃から10℃に低下させた時のNSR1 mRNA量の変化を示すノーザンブロット分析の結果である。上部に低温処理後の培養時間を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

ン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

図4は、培養温度を30℃から10℃に低下させた時のAAH1 mRNA量の変化を示すノーザンブロット分析の結果である。上部に低温処理後の培養時間を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

図5は、培養温度を30℃から10℃に低下させた時のYKR075C mRNA量の変化を示すノーザンブロット分析の結果である。上部に低温処理後の培養時間を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

図6は、培養温度を30℃から10℃に低下させた時のOLE1 mRNA量の変化を示すノーザンブロット分析の結果である。上部に低温処理後の培養時間を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

図7は、培養温度を30℃から10℃に低下させた時のACT1 mRNA量の変化を示すノーザンブロット分析の結果である。上部に低温処理後の培養時間を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

図8は、pUG35-MET25をレポーターベクターとして、DBP2のプロモーターの機能を有するDNA断片をEGFP DNAの5'側上流に連結したプラスミドの構造を示したものである。またDNA配列A (G C T C A T C G) の位置と、この配列を除去するためのInverse PCRのプライマー (RPC19-DBP2 IGR-cis FおよびRPC19-DBP2 IGR-cis Rについては、それぞれDBP2 -cis FおよびDBP2 -cis Rと略記されている) の位置も示している。

図9は、DBP2のプロモーターの機能を有するDNA断片とEGFP DNAとを連結した際の、培養温度を30℃から10℃に低下させた時のEGFP mRNA量の変化を示すノーザンブロット分析の結果である。上部に低温処理後の培養時間を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

図10は、DBP2のプロモーターの機能を有するDNA断片をEGFP DNAに対して逆方向に連結した際の、培養温度を30℃から10℃に低下させた時のEGFP mRNA量の変化を示すノーザンブロット分析の結果である。上部に低温処理後の培養時間を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

図11は、HMT1のプロモーターの機能を有するDNA断片とEGFP DNAを連結した際

の、培養温度を30℃から10℃に低下させた時のEGFP mRNA量の変化を示すノーザンブロット分析の結果である。上部に低温処理後の培養時間を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

図12は、HMT1のプロモーターの機能を有するDNA断片をEGFP DNAに対して逆方向に連結した際の、培養温度を30℃から10℃に低下させた時のEGFP mRNA量の変化を示すノーザンブロット分析の結果である。上部に低温処理後の培養時間を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

図13は、HSP12のプロモーターの機能を有するDNA断片とEGFP DNAを連結した際の、培養温度を30℃から10℃に低下させた時のEGFP mRNA量の変化を示すノーザンブロット分析の結果である。上部に低温処理後の培養時間を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

図14は、HSP12のプロモーターの機能を有するDNA断片をEGFP DNAに対して逆方向に連結した際の、培養温度を30℃から10℃に低下させた時のEGFP mRNA量の変化を示すノーザンブロット分析の結果である。上部に低温処理後の培養時間を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

図15は、DNA配列A (G C T C A T C G) を含むDBP2のプロモーターの機能を有するDNA断片から該配列を除いた改変されたDBP2のプロモーターの機能を有するDNA断片 (右) および完全なDBP2のプロモーターの機能を有するDNA断片 (左) を用いた培養温度を30℃から10℃に低下させた時のEGFP mRNA量の変化を示すノーザンブロット分析の結果である。上部に低温処理後の培養時間を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

図16は、DNA配列B (G A G A T G A G) を含むHMT1のプロモーターの機能を有するDNA断片から該配列を除いた改変されたHMT1のプロモーターの機能を有するDNA断片 (右) と完全なHMT1のプロモーターの機能を有するDNA断片 (左) を用いた培養温度を30℃から10℃に低下させた時のEGFP mRNA量の変化を示すノーザンブロット分析の結果である。上部に低温処理後の培養時間を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさがmRNA量を示している。

図17は、上段に ADH1 プロモーター、TDH3 プロモーターまたは HSP12 の低温

誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含むプラスミドの構築物、中段および下段に HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片の転写活性を、酵母において ADH1 プロモーターおよび TDH3 プロモーターの転写活性と比較するために行った、ノーザンブロット分析の結果を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさが EGFP mRNA 量を示している。

図 18 は、上段に TDH3 プロモーターまたは HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含むプラスミドの構築物、下段には HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を用いた場合のタンパク質生産能を、酵母において TDH3 プロモーターのタンパク質生産能と比較するために行った、ウェスタンブロット分析の結果を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさが EGFP タンパク質量を示している。

図 19 は、上段に HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片、EGFP の ORF および CYC1 ターミネーターを含む発現カセットを、それぞれの本来のプロモーターを除いたセントロメアを複製開始点とする pUG35、2 μ を複製開始点とする pYES2、または 2 μ を複製開始点としかつ弱いロイシン合成酵素遺伝子 (leu2-d) を有する pYEX-BX に挿入した発現プラスミドの構築物、中段および下段に HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片の転写活性化能がプラスミド自体の構造に依存しないことを示すノーザンブロット分析の結果を示す。各レーン中のドットの濃さおよび大きさが EGFP mRNA 量を示している。

図 20 は、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片のタンパク質生産能が、プラスミド自体の構造に依存しないことを示す SDS-PAGE 分析の結果である。各レーン中の矢印で示したバンドの濃さおよび大きさが EGFP タンパク質量を示している。

図 21 は、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片のタンパク質生産能が、酵母サッカロミセス・セレビシエの株に依存しないことを示す SDS-PAGE 分析の結果である。各レーン中の矢印で示したバンドの濃さおよび大きさが EGFP タンパク質量を示している。

図 22 は、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含む発

現ベクターのタンパク質生産能が、酵母の既存の発現ベクターよりも優れていることを示す SDS-PAGE 分析の結果である。各レーン中の矢印で示したバンドの濃さおよび大きさが EGFP タンパク質量を示している。

図 2 3 は、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含む発現ベクターのタンパク質生産能が、広い低温域で誘導されることを示す SDS-PAGE 分析の結果である。各レーン中の矢印で示したバンドの濃さおよび大きさが EGFP タンパク質量を示している。

図 2 4 は、メタノール酵母ピキア・パストリスに HSP12 プロモーター、EGFP の ORF、CYC1 ターミネーターを含むカセットを組み込み、EGFP タンパク質がピキア・パストリス内で低温により誘導生産されたことを示すウエスタンブロット分析の結果である。

図 2 5 は、不凍タンパク質 RD3 が、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片により可溶性タンパク質として発現したことを示すウエスタンブロット分析の結果である。各レーンのバンドの濃さおよび大きさが RD3 タンパク質量を示している。

図 2 6 は、2 種の蛍光タンパク質、ECFP および DsRed を、pLTex321 を用いて低温誘導により発現させた結果である。

発明を実施するための最良の形態

〔実施例〕

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

実施例 1 低温誘導性遺伝子の同定

酵母サッカロミセス・セレビシエ YPH500 株 (Stratagene 社より購入) を 10ml の YEPD 培地 (2% バクトペプトン、1% バクトイーストエクストラクト、2% グルコース) に一白金耳植菌し、30℃ で 2 日間振とう培養した。この培養液から 5ml を 1000ml の YEPD 培地に植菌し、600nm における吸光度が約 2 になるまで 30℃ で振とう培養した (培養液 1)。

この培養液1から50mlを分取して集菌し（低温処理前サンプル）、酵母菌体を液体窒素で凍結させ、 -80°C ディープフリーザーにてRNA調製時まで保管した。培養液1の残りはすみやかに予め 10°C に設定した振とう水浴に浸し、30分間振とうして、急冷した。次いで、予め 10°C に設定しておいた低温恒温槽に移し、 10°C での振とう培養を続けた。 10°C の振とう水浴に培養液を浸した時点を0分として、15分、30分、2時間、4時間、8時間後に上記と同じ方法で50mlの培養液を分取し（低温処理後サンプル）、酵母菌体を回収し、 -80°C で保管した。

回収した酵母菌体からのRNA調製は、ホットフェノール法に従って行った。回収した酵母菌体に予め 65°C に加温したNaOAc/SDS溶液（20mM NaOAc (pH5.5)、0.5% SDS、1mM EDTA）10mlを加え、さらに 65°C に加温した20mM NaOAc (pH5.5) 飽和フェノールを加えた。 65°C で10分間よく攪拌し、次いで氷中で5分間冷却した。遠心分離をして水層を回収した後、エタノール 30mlを加え、 -80°C で30分間冷却し、遠心分離によりRNAを回収した。上層を捨てた後、70%エタノールを加えて洗浄後、再び遠心分離し、RNAを沈殿として回収した。このRNAをNaOAc/SDS 1mlに溶かした後、フェノール抽出を2回行った。次いで2-プロパノール 500 μl を加えて -80°C で20分間冷却し、遠心分離によってRNAを回収し、上記のように70%エタノールで洗浄した。さらに沈殿として回収されたRNAをNaOAc/SDS 200 μl に溶解し、上記のようにエタノール沈殿および70%エタノール洗浄を行った。最終的に蒸留水200 μl にRNAを溶かした後、小分子RNAを除去するために、Qiagen RNeasy Mini Kit（キアゲン社）を用い、添付のプロトコルに従ってRNAを精製した。

蛍光色素で標識されたDNAは、上記のように調製した酵母全RNA15 μg とオリゴ（dT）5 μg を用い、DNAチップ研究所のマニュアルに従って作製した。蛍光色素標識にはアマシャムバイオテク社のCy3-dUTP（低温処理前サンプル）、Cy5-dUTP（低温処理後サンプル）を用いた。また、DNAマイクロアレイと標識したcDNAのハイブリダイゼーションは、DNAチップ研究所のマニュアルに従って行った。

ハイブリダイゼーションを行い、洗浄したDNAマイクロアレイはAxon社GenePix 4000AおよびGenePix Proプログラムを用いて分析し、DNAマイクロアレイ上にスポットされた各遺伝子にハイブリダイズしているCy3由来の蛍光およびCy5由来の蛍

光の強度を測定した。次いで、得られたデータをSilicon Genetics社のGene Springプログラムで解析し、データの平均化、標準化、および時系列解析を行った。操作法はこれらのプログラムのマニュアルに従った。

この解析を行った結果、15分、30分、2時間、4時間、8時間のいずれかの時点でCy5（低温処理後サンプル）の蛍光強度がCy3（低温処理前）サンプルの蛍光強度の3倍以上である遺伝子スポットについて低温誘導性プロモーターに支配された遺伝子と判定し、DNAチップ研究所から提供された遺伝子の配置図から遺伝子名を特定した。このようにして同定された低温誘導性遺伝子としては新規な遺伝子を以下の表4に記載する。

表 4

3倍以上の低温誘導を示す遺伝子

番号	系統的 遺伝子名	通称名	0.25hr (標準化)	0.5hr (標準化)	2hr (標準化)	4hr (標準化)	8hr (標準化)
1	YAL014C		1.0033	1.38948	1.72818	2.9439597	4.03293
2	YAL015C	NTG1	1.30889	1.37036	2.00195	2.6074	3.3652697
3	YAL025C	MAK16	2.23906	3.4162998	2.42264	1.12295	0.8204
4	YAL034C	FUN19	0.6976	0.74361	2.20462	4.08124	1.68092
5	YBL048W		0.88448	0.8266	1.09091	2.02884	3.3299603
6	YBL049W		1.03575	1.05359	1.34462	2.65459	4.5075
7	YBL054W		2.15287	3.11488	1.74043	0.62387	0.52929
8	YBL056W	PTC3	1.1519	1.17583	2.13383	2.88587	4.9089103
9	YBL065W		0.86021	0.96902	1.54386	2.37517	4.7262497
10	YBL078C	AUT7	1.18513	1.2101	1.48343	2.94463	5.8092504
11	YBR016W		0.98765	0.9521	1.62529	3.0799499	2.9415097
12	YBR018C	GAL7	0.66284	0.62314	0.7807	1.93283	3.0417998
13	YBR024W	SC02	1.24344	1.20799	1.80866	3.0938697	3.6857402
14	YBR034C	HMT1	2.63514	3.09186	0.81714		0.6994
15	YBR045C	GIP1	0.95867	1.00611	2.66207	5.17561	3.44039
16	YBR047W		1.05117	0.92493	1.34783	2.19222	3.0629797
17	YBR050C	REG2	1.54439	2.35019	4.04587	6.1531	1.82178
18	YBR072W	HSP26	1.14509	1.03625	0.67711	1.38069	3.6218097
19	YBR116C		0.8781	0.90162	0.87838	5.7050705	7.27097
20	YBR117C	TKL2	0.86577	0.81363	2	3.31154	7.0771995
21	YBR126C	TPS1	0.91332	0.74795	1.15979	2.61072	3.6894302
22	YBR148W	YSW1	0.89222	1.07221	1.66102	3.1233997	1.70299
23	YBR199W	KTR4	1.0203	0.98227	1.44268	1.95379	3.15104

24	YBR223C		0.88953	0.87627	1.36441	3.0317502	3.5880897
25	YBR296C	PH089	2.39344	5.2771997	8.24286	6.0016	1.35429
26	YBR297W	MAL33	1.6135	2.16031	1.89716	2.53522	4.09979
27	YBR298C	MAL31	1.03296	1.30158	1.65693	2.67207	3.10517
28	YBR301W		0.87094	0.98242	1.74468	3.0934799	2.27173
29	YCL051W	LRE1	0.77913	0.98816	2.06154	3.2779498	3.2061903
30	YCR005C	CIT2	0.84784	0.8432	1.74417	2.0718	3.03626
31	YCR072C		2.54439	3.15586	1.28448	0.40795	0.59545
32	YCR107W	AAD3	1.36231	1.59594	1.75516	2.30492	4.79259
33	YDL022W	GPD1	0.95536	0.88068	1.64979	3.97264	3.5084
34	YDL024C	DIA3	0.88413	0.75221	1.36538	2.46758	3.6631303
35	YDL031W	DBP10	1.61122	2.08052	3.27619	2.20487	1.43297
36	YDL037C		3.0142403	2.70624	0.3301	0.14693	0.47497
37	YDL039C	PRM7	4.11342	4.6858206	0.46122	0.18271	0.12441
38	YDL059C	RAD59	1.27384	1.32102	2.01786	3.62362	6.0652
39	YDL070W	BDF2	1.0365	1.44972	2.60526	2.71815	3.20639
40	YDL075W	RPL31A	1.56944	2.0143	3.0091102	2.4121	0.75203
41	YDL113C		0.97938	0.92197	1.28113	2.10491	3.54966
42	YDL115C		1.0908	1.15849	1.37566	1.99613	3.00302
43	YDL125C	HNT1	1.22652	1.30884	3.05383	4.68391	8.5493
44	YDL169C	UGX2	1.2128	1.28893	2.17714	4.49506	1.66542
45	YDL204W		0.9393	0.73074	1.38918	5.69632	9.932331
46	YDL243C	AAD4	1.45847	1.67523	1.94364	2.48658	4.03121
47	YDR003W		1.04936	1.11417	1.96771	2.83599	3.64743
48	YDR018C		1.08121	1.19178	1.31746	2.47958	4.25155
49	YDR056C		1.15346	1.17336	2.27527	3.2575502	3.2205
50	YDR070C		1.02834	0.86121	1.02096	4.63736	11.93918
51	YDR111C		1.34719	1.391	1.91391	3.1618202	4.73053
52	YDR174W	HMO1	1.1481	1.36264	1.92944	2.88877	3.26418
53	YDR184C	ATC1	2.3198	3.3462002	1.25904	0.76762	0.6323
54	YDR219C		1.14019	1.30057	2.38916	2.91331	3.7844203
55	YDR253C	MET32	0.88377	0.92164	1.01786	1.74309	3.23206
56	YDR256C	CTA1	1.00678	1.3297	1.0625	2.19923	5.23997
57	YDR262W		1.00281	1.13639	1.90785	2.68828	3.6677098
58	YDR306C		1.03452	0.97753	2.19792	3.3892598	4.26821
59	YDR336W		1.46868	1.70028	2.3625	3.4174497	1.51793
60	YDR346C		1.48413	2.06148	3.6093798	3.1203103	2.72309
61	YDR387C		0.78635	0.72793	1.51411	2.63446	3.0599303
62	YDR398W		2.50124	3.5828202	2.09428	0.81503	0.47692
63	YDR435C	PPM1	1.19833	1.26417	1.83004	2.43209	3.35998
64	YDR453C		1.02314	0.89832	1.0219	3.6123	4.25316

65	YDR471W	RPL27B	1.50493	2.08128	3.1332302	1.31769	0.42956
66	YDR492W		2.58023	6.62935	13.0743	10.20106	5.89573
67	YDR496C		1.93937	3.0013602	3.0263703	1.37132	0.60135
68	YDR504C		1.00437	1.03392	1.58559	2.33226	3.02352
69	YDR516C		0.81438	0.69661	1.57257	2.9018703	3.2232897
70	YDR530C	APA2	1.02962	1.13114	1.66489	3.4215798	3.88631
71	YDR542W		0.92785	1.2273	1.625	3.1067197	2.69385
72	YEL011W	GLC3	0.96412	0.75124	2.88229	7.0288205	11.758249
73	YEL039C	CYC7	0.92893	0.73858	1.17658	3.8259	3.18927
74	YEL072W		1.19934	1.57944	4.93791	8.34776	12.152559
75	YER020W	GPA2	0.95994	1.08487	2.46207	3.864	2.30808
76	YER042W	MXR1	1.35873	1.35649	1.62658	2.16199	3.4200802
77	YER053C		0.99461	0.85507	1.66765	3.3705401	4.5278196
78	YER056C	FCY2	2.64863	3.2977998	1.35123	0.32066	0.22148
79	YER065C	ICL1	1.17778	1.66126	2.44286	2.98419	4.15741
80	YER066W		0.78102	0.87729	2.92213	4.50196	4.60095
81	YER067W		0.50699	0.62875	3.71825	7.8568697	8.223431
82	YER078C		1.03939	1.09121	2.2375	3.31545	1.94628
83	YER079W		0.85437	0.82674	1.50259	3.6082	1.96935
84	YER117W	RPL23B	1.51201	1.94439	3.17666	2.00212	0.83311
85	YER150W	SPI1	0.84877	0.77781	1.29897	2.80709	3.0019
86	YFL014W	HSP12	1.20927	0.9725	0.87215	2.46087	9.3936205
87	YFL030W		1.13982	1.11851	1.65561	2.55246	3.8397
88	YFL055W	AGP3	1.00927	1.30234	4.47706	10.714099	18.273357
89	YFL056C	AAD6	1.16193	1.32224	1.62179	2.41718	3.5401
90	YFL057C		1.31235	1.54697	1.78583	2.65886	4.9862905
91	YFR014C	CMK1	1.23873	1.40431	1.78136	2.79512	4.85549
92	YFR015C	GSY1	0.80209	0.61885	1.56667	3.61418	2.04716
93	YFR017C		0.75176	0.65432	1.81091	3.7296097	4.3214703
94	YFR053C	HXK1	1.0097	1.14979	3.8469803	4.8080006	4.44604
95	YGL029W	CGR1	1.47899	2.80426	3.41014	2.20962	1.07818
96	YGL033W	HOP2	0.88809	0.8757	0.86	1.82706	3.46097
97	YGL045W		0.84499	0.88588	1.675	3.94022	3.7547197
98	YGL075C	MPS2	0.92903	0.96407	1.08609	1.9752	3.1905599
99	YGL122C	NAB2	0.81065	0.98731	2.9251502	3.3459601	4.15031
100	YGL135W	RPL1B	1.54394	1.91542	3.12628	2.31277	1.20963
101	YGL179C	TOS3	0.92586	0.97704	3.6000001	5.87365	4.88168
102	YGL184C	STR3	0.93984	0.96212	1.01517	1.91628	3.90721
103	YGL255W	ZRT1	1.94464	2.8635201	3.5871997	4.1866007	10.74703
104	YGL261C		0.93717	1.04224	1.66667	3.0096	3.47758
105	YGR008C	STF2	1.01723	0.82271	2.60458	6.17081	12.13232

106	YGR043C		1.10852	1.05999	1.22387	4.53298	12.765181
107	YGR053C		0.87555	0.85445	1.38938	1.89862	3.0796297
108	YGR088W	CTT1	0.73144	0.5275	2.61392	8.44166	9.138019
109	YGR102C		1.02841	1.10224	0.92	1.99894	3.01003
110	YGR154C		1.08783	1.16426	1.53119	2.40742	4.68076
111	YGR197C	SNG1	1.00376	1.1192	2.2019	3.2474	3.1514597
112	YGR222W	PET54	1.26054	1.42349	1.60366	2.08335	3.08212
113	YGR223C		1.19349	1.26046	2.53929	3.2797003	3.1076899
114	YGR251W		1.6456	2.2153	2.10687	1.95891	3.09891
115	YGR256W	GND2	1.00473	0.91066	0.80725	1.505	3.26524
116	YGR262C		1.1995	1.26261	1.58052	2.31353	3.66908
117	YGR286C	BI02	1.27075	1.81795	4.17834	4.07809	2.96402
118	YGR294W		0.95577	1.15384	2.4	3.1283402	1.82326
119	YHL016C	DUR3	0.87458	1.24974	3.37398	1.98922	1.26147
120	YHL021C		0.53181	0.33107	1.4273	3.25184	3.4255702
121	YHL036W	MUP3	0.96214	1.05319	2.00749	2.55455	3.1350303
122	YHL046C		0.88892	1.08159	2.48555	3.8127797	3.1550698
123	YHR066W	SSF1	2.03287	3.06945	1.28049	0.39122	0.42343
124	YHR087W		0.96424	0.85725	1.97701	8.501441	11.07285
125	YHR138C		1.38952	1.42322	3.06207	3.10159	4.42282
126	YHR139C	SPS100	0.98016	1.02298	2.97178	10.10476	17.492609
127	YHR141C	RPL42B	1.67425	2.11846	3.2603197	1.71907	0.50346
128	YHR146W		0.73244	1.10551	1.84584	3.1886997	3.3606603
129	YIL036W	CST6	1.0246	1.11707	2.81361	3.82443	3.8948402
130	YIL045W	PIG2	0.71006	0.52756	1.42746	3.0158298	2.69356
131	YIL069C	RPS24B	1.74011	2.2868	3.1866403	1.75181	0.68099
132	YIL077C		1.10246	1.15074	2.4375	3.40083	2.0907
133	YIL107C	PFK26	0.90527	0.77253	1.14115	2.4408	3.8814597
134	YIL136W	OM45	0.84002	0.71072	0.72702	2.82218	3.83757
135	YIL143C	SSL2	1.12017	1.16916	2.10938	2.7908301	3.29
136	YIL153W	RRD1	0.89555	0.93818	1.50312	2.78051	3.1932
137	YJL132W		0.87519	0.78836	1.25191	1.77312	3.03586
138	YJL155C	FBP26	0.95693	0.91742	1.43721	2.23459	4.2299094
139	YJL223C	PAU1	0.94032	1.07645	2.33929	4.01076	3.37687
140	YJR085C		1.22341	1.13732	1.30019	1.75168	3.03429
141	YJR155W	AAD10	1.11394	1.16776	1.52716	2.03351	3.72837
142	YKL026C	GPX1	1.0308	0.96926	2.38347	4.73596	8.17473
143	YKL070W		1.77472	3.02877	7.3672304	13.586381	14.590239
144	YKL071W		1.36053	1.46881	1.66965	2.03659	3.51212
145	YKL078W		2.37036	3.2950103	1.38636	0.90211	0.7957
146	YKL087C	CYT2	1.08878	1.13993	1.52257	2.52182	4.00504

147	YKL089W	MIF2	0.9988	0.93813	1.48333	3.3537698	3.56049
148	YKL090W		0.95164	1.0171	1.17553	3.4655097	2.18442
149	YKL091C		0.75033	0.54752	1.17633	3.13907	4.35414
150	YKL094W	YJU3	1.11442	1.15337	1.49033	2.88253	5.11229
151	YKL103C	LAP4	1.11797	1.18683	1.50443	2.29227	3.98024
152	YKL125W	RRN3	1.28447	1.13671	1.45736	2.11759	3.15104
153	YKL150W	MCR1	0.98958	0.91165	1.66348	3.1258898	4.36814
154	YKL151C		1.02779	0.87802	1.28317	2.40705	3.64677
155	YKL162C		0.90755	1.10725	1.61719	2.48505	5.47137
156	YKL187C		0.95593	1.04668	6.15217	22.404268	15.74071
157	YKL224C		0.89848	1.12533	2.81176	3.25963	2.08497
158	YKR049C		1.25539	1.2027	1.75	3.07264	2.44532
159	YKR075C		3.0095403	3.27039	0.50806	0.95682	0.91958
160	YKR077W		1.14206	1.71613	1.91304	4.17779	2.21691
161	YKR100C		0.91584	1.08788	1.70127	2.34189	3.0141
162	YLL055W		1.13227	1.26922	3.6136997	3.98156	4.27876
163	YLL056C		0.98863	1.09245	2.02424	4.75816	7.3932605
164	YLR009W		1.60275	2.40353	3.1268404	1.1439	0.41884
165	YLR145W		0.97333	1.2659	1.44364	4.03507	3.76035
166	YLR149C		0.63981	0.81805	1.11078	2.54315	3.70763
167	YLR164W		0.7098	0.64934	1.0303	3.7946599	3.82147
168	YLR251W		0.80386	0.68135	0.7995	1.78338	3.56716
169	YLR252W		0.88886	0.75325	0.93727	1.98089	3.0293598
170	YLR266C		1.12845	1.25712	1.67885	2.21115	3.2613397
171	YLR311C		0.9542	1.0924	1.99216	3.5065703	5.76001
172	YLR312C		1.12083	1.11103	2.60448	4.70583	7.24224
173	YLR327C		0.69919	0.88948	1.2234	3.0811	1.38007
174	YLR413W		2.57574	3.95178	3.42857	1.36255	0.67484
175	YLR421C	RPN13	1.27411	1.25963	1.62864	2.07345	3.52192
176	YML004C	GL01	1.0562	1.13595	1.15769	2.08466	3.8888502
177	YML128C		1.06312	0.88233	1.19443	3.34315	7.0703206
178	YML131W		1.25133	1.36287	1.6693	2.30028	4.31475
179	YMR030W		0.71059	0.81793	1.29167	3.37439	1.48566
180	YMR090W		1.25887	1.12985	1.38467	2.31588	3.95838
181	YMR100W	MUB1	0.98043	1.16973	2.1046	2.71536	3.0512598
182	YMR105C	PGM2	0.93366	0.67889	0.84615	2.33853	3.23185
183	YMR107W		1.05274	0.9975	3.35795	13.346421	26.729939
184	YMR139W	RIM11	0.84478	0.8269	1.88423	2.86575	3.3071597
185	YMR246W	FAA4	1.51515	2.70731	7.9028206	5.6360803	2.22328
186	YMR255W	GFD1	0.86952	1.19143	1.6185	3.07659	1.97355
187	YMR258C		0.83821	0.75127	1.81532	2.99214	3.62522

188	YMR262W		0.91145	0.88096	1.56184	3.65197	3.4286199
189	YMR271C	URA10	1.18771	1.17152	1.64009	3.0692298	6.2542396
190	YMR316W	DIA1	1.14344	1.59805	3.15714	2.4773	3.35398
191	YMR320W		1.01219	1.3638	1.81944	3.53727	1.9338
192	YMR322C		1.07036	0.92294	1.04425	3.2590702	3.9411802
193	YNL011C		0.78709	0.83233	1.16337	2.48838	3.23587
194	YNL024C		1.46682	2.16135	4.9626203	6.2175603	3.3494
195	YNL112W	DBP2	4.01042	6.8630104	6.7637796	3.18022	0.77863
196	YNL117W	MLS1	1.01106	1.25314	1.05263	1.76615	3.1688
197	YNL124W		1.88126	3.18683	1.20395	0.32775	0.43034
198	YNL141W	AAH1	3.2322798	4.3802	2.65306	0.76989	0.63074
199	YNL142W	MEP2	1.11873	1.76151	3.07634	1.71723	1.73964
200	YNL178W	RPS3	1.86694	2.28552	3.26319	2.9932404	1.222
201	YNL194C		0.60936	0.26556	0.54245	3.3947198	2.92208
202	YNL195C		0.77047	0.53543	0.54603	2.8285697	3.674
203	YNL213C		1.21604	1.28292	1.8547	2.64103	3.2764103
204	YNL244C	SUI1	1.42833	1.67499	2.85473	3.05486	3.30479
205	YNL331C	AAD14	1.27426	1.28444	1.46592	1.74846	3.3124697
206	YNR039C	ZRG17	1.35281	1.43951	1.24797	1.87414	3.47606
207	YNR051C	BRE5	1.02042	1.58095	2.44323	3.06008	3.4274
208	YNR053C		2.43279	3.8915102	2.9575803	0.96136	0.70268
209	YNR071C		1.4138	1.79554	2.05263	3.85069	1.97059
210	YNR075W	COS10	1.01794	1.38808	3.92754	5.2499	3.21607
211	YNR076W	PAU6	0.95206	1.06779	1.9951	3.30685	2.41205
212	YOL002C		1.29616	2.15787	9.937701	10.26189	2.54972
213	YOL016C	CMK2	0.98959	1.09154	2.51295	2.511	3.29924
214	YOL084W	PHM7	0.89374	1.06172	1.34868	3.0450897	2.44176
215	YOL101C		1.45019	2.04909	19.401777	25.94569	5.15477
216	YOL108C	INO4	1.00123	1.1017	2.7381	3.71228	4.51399
217	YOL116W	MSN1	0.85785	0.93227	1.41	2.236	3.92998
218	YOL124C		2.62574	3.8273304	1.82258	0.59246	0.50758
219	YOL127W	RPL25	1.43301	1.79808	3.0211596	2.16872	0.60117
220	YOL132W		1.04835	1.24031	1.54286	3.106	1.38277
221	YOL153C		0.5938	0.52128	1.14079	2.9794703	3.91833
222	YOL154W		1.34726	1.6499	1.56098	3.08407	2.6685
223	YOL161C		0.96664	1.03449	2.15947	3.3816001	2.71004
224	YOL162W		0.96196	1.16852	2.69014	5.84978	2.8762603
225	YOL163W		0.96778	1.11322	2.8315797	5.91772	10.61694
226	YOL165C	AAD15	1.22875	1.30924	1.71266	2.40526	3.41076
227	YOR019W		0.9127	0.89891	1.57317	3.0450897	2.8125703
228	YOR031W	CRS5	0.99219	0.97751	1.31677	2.15347	4.49082

229	YOR043W	WHI2	1.13856	1.49043	2.8123202	2.99276	3.5548503
230	YOR095C	RKI1	2.54298	3.30516	2.6587	0.74247	0.51106
231	YOR292C		0.8462	0.8146	1.8877	3.63797	3.36628
232	YOR298W		1.13806	1.34351	2.20339	3.03402	1.37237
233	YOR391C		1.02427	0.93243	1.21622	3.1344903	4.50622
234	YOR394W		0.93912	1.01044	2.27089	3.1992402	3.01734
235	YPL004C		0.96002	0.89191	1.30196	2.85464	4.09551
236	YPL014W		0.52817	0.7035	3.98544	5.42407	2.79718
237	YPL015C	HST2	0.9054	0.99103	1.71743	2.89551	3.0497203
238	YPL043W	NOP4	1.46609	2.46296	3.48128	1.46577	0.92248
239	YPL054W	LEE1	1.2276	1.48657	2.8826299	4.24342	4.39311
240	YPL093W	NOG1	2.31796	3.42804	2.76864	0.35724	0.21256
241	YPL107W		1.20868	1.27572	1.78309	4.46614	4.12846
242	YPL122C	TFB2	1.20815	1.39332	2.20091	3.24515	1.51419
243	YPL149W	APG5	1.24369	1.40163	1.99367	2.35995	3.04209
244	YPL171C	OYE3	1.23205	1.16524	1.72912	2.60267	3.9988701
245	YPL186C		0.93532	0.73402	1.39045	4.42236	7.3833003
246	YPL223C	GRE1	1.02493	0.95208	0.96131	4.45988	19.046879
247	YPL224C	MMT2	1.10505	1.2202	1.81892	2.67785	3.53972
248	YPL245W		1.25743	1.27819	1.94444	3.15968	0.71742
249	YPL250C	ICY2	1.35039	1.62825	1.53159	1.8243	3.9844902
250	YPL280W		1.00028	0.8794	1.08612	3.5273502	6.96237
251	YPL281C	ERR2	0.85369	0.76881	0.77273	1.15636	3.3315897
252	YPL282C		0.94257	1.01298	2.54118	3.04157	2.20817
253	YPR045C		0.90533	0.81637	1.32194	2.57976	3.18647
254	YPR061C		1.28251	1.48397	2.21667	2.86721	3.37915
255	YPR086W	SUA7	1.33226	1.38649	2.12824	2.46114	3.1201
256	YPR121W	THI22	0.85368	1.03169	2.96296	4.04236	2.568
257	YPR143W		1.24535	1.88597	3.25366	2.03536	1.03127
258	YPR160W	GPH1	0.93853	0.73339	1.57334	3.6765997	3.65112
259	YPR200C	ARR2	1.19842	1.10383	1.30505	1.7543	3.19482

表4には、酵母の系統的遺伝子名、通称名（与えられている場合のみ）（これらの遺伝子名および通称名は、酵母ゲノムデータベース（*Saccharomyces cerevisiae* genome database; <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>）を参照されたい）および低温処理前サンプルの蛍光強度の標準化した値に対する各時間の低温処理後サンプルの蛍光強度の標準化した値の比を併記してある。

実施例2 低温誘導性遺伝子の低温誘導性の確認

DNAマイクロアレイ解析によって同定された低温誘導性遺伝子について、その低温誘導性を確認するために、Sambrookら、Molecular Cloning、Cold Spring Harbor Laboratoryの方法に従ってノーザンブロット分析を行った。ノーザンブロット分析によってRNAの量を測定するために、まず目的とするRNAを特異的に検出するためのプローブDNAをポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法によって調製した。本実施例においては、実施例1において同定された低温誘導性遺伝子の1つであるYFL014W (HSP12) のDNAプローブを作製した際の方法を具体的に示す。サッカロミセス・セレビシエYPH500株のゲノムDNAならびにHSP12遺伝子のORF内の塩基配列に相補的なHSP12-FプライマーおよびHSP12-Rプライマーを用い、Expand High Fidelity PCR system (Roche社) を使用して、マニュアルに従ってTakara PCR Thermal cycler MPによりHSP12フラグメント約330塩基を増幅した。

プライマーの配列は、以下の通りである。なおプライマーの位置については、上述の酵母ゲノムデータベースを参照されたい。

HSP12-F : A T G T C T G A C G C A G G T A G A A A A G (配列番号1)

HSP12-R : T T A C T T C T T G G T T G G G T C T T C T T C (配列番号2)

またPCRは、各々のプライマー300nM、dNTP(4種のデオキシヌクレオチド三リン酸の混合溶液) 200 μ M、サッカロミセス・セレビシエYPH500株のゲノムDNA 100ngならびにExpand High Fidelity PCR systemに添付されたバッファー(1 X)およびExpand HiFi DNAポリメラーゼ2.6Uを含む反応溶液100 μ lを用いて、第1ステップ: 95°Cで2分、第2ステップ: 95°Cで30秒(変性)、55°Cで30秒(アニーリング)および72°Cで1分(伸長)のサイクルを35サイクルおよび第3ステップ: 72°Cで5分で行った。

次いで、調製したHSP12フラグメントをpT7Blue T-ベクター (Novagen社) と連結し、該ベクターを用いて大腸菌DH5 α を形質転換した。幾つかの形質転換体を試験管で培養した後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep kit (Bio Rad社) を用いてプラスミドを調製し、制限酵素による切断パターンから目的のプラスミドを保有した形質転換体を判別した。次に得られた形質転換体を80mlの培養液で培養し、QuantumPrep Plasmid MidiPrep kit (Bio Rad社) を用いてプラスミドを調製した。

得られたHSP12フラグメントの塩基配列をDNA sequencing kit(アプライドバイオシステムズ社)を用いて配列解析を行い、得られた塩基配列をゲノムデータベース(Saccharomyces cerevisiae genome database; <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>)のHSP12の塩基配列と比較して同定した。次いで、HSP12フラグメントを含むpT7Blue T-ベクターから制限酵素によりHSP12フラグメントを切りだし、低融点アガロース(FMC社)を用いたアガロース電気泳動によりHSP12フラグメントを分離、回収した。このHSP12フラグメントをAlkPhos Direct Labeling Module(アマシャムバイオテク社)を用いて、添付のプロトコルに従ってアルカリフォスファターゼ標識した。

同様に、YNL112W(DBP2)、YGR159C(NSR1)、YNL141W(AAH1)、YKR075C、YGL055W(OLE1)、およびYFL039C(ACT1)についてもそれぞれORF内の塩基配列に相補的なプライマーを用いて、同様な操作によりノーザンブロット用プローブを作製した。

プライマーの配列は以下の通りである。

DBP2に対するプライマー：

DBP2-F : G G A T G A C T T A C G G T G G T A G A G A T C (配列番号 3)

DBP2-R : A A G A T A C C T C T G G C G G C C A C (配列番号 4)

NSR1に対するプライマー：

NSR1-F : G G T A A C A A G A A G G A A G T T A A G G C T T C (配列番号 5)

NSR1-R : T G T T T T C T T T G A A C C A G C G A A A G (配列番号 6)

AAH1に対するプライマー：

AAH1-F : G G T T T C T G T G G A G T T T T T A C A G G A G (配列番号 7)

AAH1-R : G C G A A T A T T T A G T G A C T A C T T C G T C C (配列番号 8)

YKR075Cに対するプライマー：

YKR075C-F : T G G A C G A T A C A A T A A T T T C G T A C C A (配列番号 9)

YKR075C-R: C A A C C T G G T T C C T A T A A A A A A T G T C T T (配列番号 10)

OLE1に対するプライマー:

OLE1-F: G G A A G C T T A T G C C A A C T T C T G G A A C T A C T A T T (配列番号 11)

OLE1-R: G G A A G C T T T T A A A A G A A C T T A C C A G T T T C G T A G (配列番号 12)

ACT1に対するプライマー:

ACT1-F: T C A A A A A G A C T C C T A C G T T G G T G A T G A A G C (配列番号 13)

ACT1-R: C A T A C G C G C A C A A A A G C A G A G A T T A G A A A C (配列番号 14)

NSR1、AAH1及びYKR075CのPCRは、上記のHSP12フラグメントの増幅と同様の条件で行った。DBP2のPCRは、上記のHSP12フラグメントの増幅の条件において、第2ステップのアニーリング温度を55℃から47℃および伸長反応時間(72℃)を1分から1.5分に変更したこと以外は同様の条件で行った。OLE1とACT1については、PCRは各々のプライマー200nM、dNTP 200 μ M、サッカロミセス・セレビスエYPH500株のゲノムDNA 1 μ gならびに1 X 天然型Pfuポリメラーゼバッファー(Stratagene)およびPfu DNAポリメラーゼ2.5Uを含む反応溶液100 μ lを用いて、第1ステップ: 94℃で2分、第2ステップ: 94℃で30秒(変性)、55℃で30秒(アニーリング)および72℃で3分(伸長)のサイクルを25サイクルおよび第3ステップ: 72℃で5分で行った。なおOLE1とACT1については、PCRによって増幅されたDNAはリン酸化せずに、直接EcoRVによって予め切断したpZEr02ベクター(インビトロゲン)にサブクローニングした。

次いで実施例1のように調製したRNA 10 μ gを用いて、1%変性アガロースゲル電気泳動を行い、次いでHybond-N+ (アマシャムバイオテク社)に一晩でRNAを転写した。このフィルターと調製した標識HSP12フラグメントのハイブリダイゼーションをAlkPhos Direct Labeling Moduleのプロトコルに従って行い、次いでCDP-

Star Detection Reagent (アマシャムバイオテック社) を用いて、ハイブリッド形成したHSP12 mRNAをX線フィルムへの感光によって検出、定量した。また同様に、ECF Detection Moduleを用いて、精製した蛍光物質の濃度をBio-Rad社Molecular Imager FX Proにより検出、定量を行った。その結果を図1に示す。図1よりHSP12 mRNAが培養温度を10℃に低下させた後4時間以降増加していることが明らかとなった。同様にして、DBP2、NSR1、AAH1、YKR075C、OLE1およびACT1についてのノーザンブロット分析の結果を図2、3、4、5、6、7に示す。DBP2、NSR1、AAH1、YKR075Cでは培養温度を10℃に低下させて1時間後に低温処理前サンプルよりもmRNA量が増加していた。一方、OLE1では同様に低温処理による増加を示し、2時間で最大のmRNA量となった。なお、DNAマイクロアレイの結果において、低温処理によってもmRNAが変化しない陰性対照としてACT1を用いてノーザンブロット分析を行った場合には、やはり低温処理によりそのmRNA量はほとんど変化しなかった(図7)。これらの結果より、HSP12、DBP2、NSR1、AAH1、YKR075C、およびOLE1の全ての場合において、DNAマイクロアレイによって得られた低温処理によるmRNA量の増加をノーザンブロット分析によって確認することができた。従って、これらの遺伝子について、低温に応答してmRNA量を増産させるプロモーターがそれぞれの遺伝子の5' 上流側の非翻訳領域に存在することが示された。

実施例3 低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片による下流のDNA配列の低温誘導

低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片を単離し、異種のDNAを下流側に連結することにより、下流のDNAからのRNAの生産を低温処理により誘導できることを以下のように確認した。まず、DBP2の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片を単離した。DBP2の5' 上流隣接遺伝子はYNL113W(RPC19)であるため、このRPC19及びDBP2に挟まれた領域(すなわち、DBP2の5' 上流側の非翻訳領域)を、それぞれRPC19のORFに隣接した3' 下流側の24塩基(RPC19-DBP2 IGR F)及びDBP2のORFに隣接した5' 上流側の28塩基(RPC19-DBP2 IGR R)からなるプライマーならびにサッカロミセス・セレビシエYPH500株のゲノムDNAを用いてPCR法によって単離した。

プライマーの配列は以下の通りであった。

RPC19-DBP2 IGR F: A T G T T A C G G A T C G A C T C A A A G A C C (配列番号 15)

RPC19-DBP2 IGR R: A T T T G C T C T A A A T T T G C C T T A A T A G T G C (配列番号 16)

PCRは、上記のHSP12フラグメントの増幅と同様の条件で行った。

次いで単離したDNAをレポータープラスミドpUG35-MET25中の改良緑色蛍光タンパク質 (EGFP) のORFの上流に以下のようにして挿入した。なお、pUG35-MET25プラスミドはpUG35 (<http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/yeast/info/tools/index.html>) をXba IとSac Iで切断し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化した後、自己環状化させることによって作製した。pUG35-MET25プラスミドをSal Iで切断し、T4 DNAポリメラーゼによって平滑末端へ変換した。次いで、PCRによって単離したDBP2の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片をT4 DNAキナーゼおよびATPを用いて両末端の水酸基をリン酸化した。このDBP2のプロモーターの機能を有するリン酸化したDNA断片と平滑末端化したpUG35-MET25プラスミドとをTaKaRa DNA Ligation Kit ver.2を用いて、添付のプロトコルに従って連結し、大腸菌DH5 α を形質転換した。得られた幾つかの形質転換体を3mlの培養液で一晩培養した後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep kitを用いてプラスミドを調製し、制限酵素の切断パターンから目的のプラスミドを保有した形質転換体を判別した。なお、この際にEGFP ORFに対して上流にDBP2プロモーターが隣接した位置関係にあるプラスミド (正方向; 図8)、および逆にRPC19側に隣接していた領域がEGFPのORFに対して直ぐ上流に連結されたプラスミド (逆方向) の両方を単離した。次にそれぞれについて得られた形質転換体を80mlの培養液で培養し、QuantumPrep Plasmid MidiPrep kitを用いてプラスミドを調製した。このプラスミドを用いて酵母サッカロミセス・セレビシエYPH500を形質転換した。この形質転換はInvitrogen社Yeast Protocol Handbookの方法に従った。得られた形質転換酵母を30℃で培養し、600nmの吸光度が1となった時点で0分のサンプルリングを行い、続けて培養温度を30℃から10℃に低下させて培養を続け、同様にサンプルリングを行った。

これらのサンプルから実施例 2 と同様の方法で酵母から RNA を調製し、ノーザンブロット分析で EGFP mRNA 量を測定した。なお、ノーザンブロット分析のためのプローブは、pGFPuv (クロンテック社) を制限酵素 Pst I および Eco RI で切断し、GFP フラグメントを回収して用いた。実施例 2 と同様の方法でノーザンブロット分析を行い、この結果を図 9 に示す。図 9 より、DBP2 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を用いることで、その下流に配置した DNA の転写を低温処理によって増加させることができることが証明された。また、pUG35-MET25 に DBP2 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を逆向きに挿入した場合には低温誘導性が見られなかったため (図 10)、図 9 に示される低温による転写活性化は DBP2 プロモーターの働きによることが確認された。

同様に実施例 1 で低温誘導性遺伝子として同定された YBR034C (HMT1) 及び YFL014W (HSP12) の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片についても低温誘導性を確認した。

まず上記の DBP2 と同様に、HMT1 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を単離した。HMT1 の 5' 上流隣接遺伝子は YBR035C (PDX3) であるため、PDX3 及び HMT1 に挟まれる領域 (すなわち、HMT1 の 5' 上流側の非翻訳領域) を、それぞれ PDX3 の ORF に隣接した 3' 下流側の 25 塩基 (PDX3-HMT1 IGR F) 及び HMT1 の ORF に隣接した 5' 上流側の 25 塩基 (PDX3-HMT1 IGR R) からなるプライマーを用いて PCR 法によって単離した。

プライマーの配列は以下の通りであった。

PDX3-HMT1 IGR F : G G G A C T G T T A A T G A A A A A T T C A A T G (配列番号 17)

PDX3-HMT1 IGR R : T A T T T T C T T T G G A T G A A T T T G T C G G (配列番号 18)

PCR は、第 2 ステップにおいてアニーリング温度を 55℃ から 50℃ に変更した以外は上記の HSP12 フラグメントの増幅と同様の条件で行った。

上記の DBP2 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片の場合と同じ方法により得られた HMT1 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を pUG35

-MET25に挿入し（このとき、逆方向に該DNA断片が挿入されたものも調製した）、上記同様にEGFP mRNA増加を指標として低温誘導性の確認を行った。その結果、HMT1の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片をEGFPのすぐ上流に正しい方向に配置した場合には低温誘導性が確認できたが（図11）、逆方向に挿入した場合には低温誘導性が見いだされなかった（図12）。以上のことから、HMT1の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片を用いることにより、下流のDNAの転写を低温により誘導することができることが示された。

さらにHSP12の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片を単離した。HSP12の5'上流隣接遺伝子はYFL015Cであったが、両遺伝子が近接しておりまたDNAの反対鎖にコーディング領域があったため、YFL015C遺伝子を一部を含むYFL015C及びHSP12に挟まれる領域（すなわち、HSP12の5'上流側の非翻訳領域）を、それぞれYFL015CのORF内アンチセンス鎖内の19塩基（-610 HSP12）及びHSP12のORFに隣接した5'上流側の28塩基（HSP12 IGR R）からなるプライマーを用いてPCR法によって単離した。

プライマーの配列は以下の通りであった。

-610 HSP12 IGR F: GATCCCACTAACGGCCAG (配列番号19)

HSP12 IGR R: TGTGTATTAGTTTTTTTGTTTTGAG (配列番号20)

PCRは第2ステップにおいてアニーリング温度を55℃から50℃に変更した以外は上記のHSP12フラグメントの増幅と同様の条件で行った。

上記のDBP2又HMT1の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片の場合と同じ方法により得られたHSP12の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片をpUG35-MET25に挿入し（このとき、逆方向に該DNA断片が挿入されたものも調製した）、上記同様にEGFP mRNA増加を指標として低温誘導性の確認を行った。その結果、HSP12の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片をEGFPのすぐ上流に正しい方向に配置した場合は低温誘導性が確認できたが（図13）、逆方向に挿入した場合には低温誘導性が見いだされなかった（図14）。以上のことからHSP12の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片を用いることにより、下流の

DNAの転写を低温により誘導することができることが示された。

実施例4 低温誘導性シス配列の同定

初期に低温誘導性を示す遺伝子の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片におけるシス配列は以下のように同定した。実施例1の実験において、まず10℃に培養温度を低下させてから15分後にシグナルが2倍以上に上がった遺伝子を同定した。同定された41個の遺伝子を下記の表5に示す。

表5

15分後に2倍以上の低温誘導を示す遺伝子

番号	系統的 遺伝子名	通称名	15分 (標準化)	番号	系統的 遺伝子名	通称名	15分 (標準化)
1	YDL039C	PRM7	4.11342	22	YDL063C		2.16531
2	YNL141W	AAH1	3.2322798	23	YOR360C	PDE2	2.08345
3	YDL037C		3.0142403	24	YHR196W		2.08005
4	YKR075C		3.0095403	25	YNL065W		2.05877
5	YER056C	FCY2	2.64863	26	YHR066W	SSF1	2.03287
6	YOL124C		2.62574	27	YLR407W		2.01923
7	YDR492W		2.58023	28	YOR101W	RAS1	2.00532
8	YLR413W		2.57574	29	YNL112W	DBP2	4.01042
9	YCRO72C		2.54439	30	YGR159C	NSR1	2.9673197
10	YOR095C	RKI1	2.54298	31	YGL055W	OLE1	2.51904
11	YNL175C	NOP13	2.5208	32	YNR053C		2.43279
12	YDR398W		2.50124	33	YPL093W	NOG1	2.31796
13	YGR283C		2.40094	34	YHR170W	NMD3	2.08971
14	YBR296C	PH089	2.39344	35	YHR148W	IMP3	2.04153
15	YDR184C	ATC1	2.3198	36	YBR034C	HMT1	2.63514
16	YOR338W		2.25481	37	YOL010W	RCL1	2.46012
17	YAL025C	MAK16	2.23906	38	YKL078W		2.37036
18	YOR063W	RPL3	2.21192	39	YMR290C	HAS1	2.35991
19	YIL096C		2.19996	40	YDR101C		2.28186
20	YER127W	LCP5	2.19577	41	YBL054W		2.15287
21	YBL042C	FUI1	2.16603				

表5には、表4と同様に酵母の系統的遺伝子名、通称名（与えられている場合のみ）および低温処理前サンプルの蛍光強度の標準化した値に対する15分間の低温処理後サンプルの蛍光強度の標準化した値の比を併記してある。

次いでGene Spring(Silicon Genetics社)を用いて、それらの各々の遺伝子のORFから600bp上流までの間に存在するシス配列を検索した。その結果、これらの遺伝子の一部に共通して存在するDNA配列として得ることができた。

シス配列は以下の通りであった。

(a) DNA配列A : G C T C A T C G

(b) DNA配列B : G A G A T G A G

具体的には、上記のDNA配列AはYNL112W(DBP2)、YGR159C(NSR1)、YGL055W(OLE1)、YNR053C、YPL093W(NOG1)、YHR170W(NMD3)およびYHR148W(IMP3)(表5の番号29～35に対応する)に共通して存在するシス配列として、またDNA配列BがYBR034C(HMT1)、YOL010W(RCL1)、YKL078W、YMR290C(HAS1)、YDR101CおよびYBL054W(表5の番号36～41に対応する)に共通して存在するシス配列として見出された。

実施例 5 低温誘導性シス配列の低温誘導性の確認

実施例4で得られたDNA配列A(G C T C A T C G)が低温誘導性を有していることを確認するために、該配列が存在するDBP2の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片から該配列を除去することによって低温誘導性が失われるか否かを確認した。まず、実施例3においてPCR法によって調製したDBP2の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片とpT7Blue T-ベクターとをTaKaRa DNA Ligation kit ver.2を用いて連結し、該ベクターを用いて大腸菌DH5 α を形質転換した。得られた形質転換体からプラスミドを調製し、配列解析を行い、塩基配列を確認した。次いで、該プラスミド中のDNA配列Aの両隣に位置する配列に相補的な外向きのプライマーを用いたInverse PCRによって、DNA配列Aを除くプラスミド全体を増幅した(図8参照)。

プライマーの配列は以下の通りであった。

RPC19-DBP2 IGR-cis F : C A G A A A A T T T T T C C T T C A G T T T A T T T G (配列番号21)

RPC19-DBP2 IGR-cis R : A T C G G C G T A (配列番号22)

PCRは、上記のHSP12フラグメントの増幅の条件において、第2ステップでアニー

リング温度を55℃から50℃および伸長反応時間(72℃)を1分から5分に変更し、ならびに第3ステップで時間を5分から10分に変更したこと以外は同様の条件で行った。

増幅されたDNAをTaKaRa DNA Ligation Kit ver.2を用いて自己環状化し、再び大腸菌DH5 α を形質転換した。次いで、得られた幾つかの形質転換体よりプラスミドDNAを調製し、塩基配列を決定することによって、DNA配列Aのみが除去され、DBP2の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片の他の塩基配列は変化していないクローンを同定した。次いでその改変クローンを鋳型として、実施例3と同じ方法により改変されたDBP2の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片をPCR法により増幅し、リン酸化した後pUG35-MET25に挿入して、レポータープラスミドを作製した。酵母サッカロミセス・セレビシエをこのレポータープラスミドを用いて形質転換し、実施例3と同様にしてサンプルを調製し、ノーザンブロット分析を行った。その結果を図15に示す。図15に示されるように、完全なDBP2の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片をEGFP DNAの上流に連結した場合(図15 +cis)に比べて、前記DNA断片からDNA配列Aを除去することにより低温誘導性が弱くなった(図15 -cis)ことから、DNA配列Aが低温誘導に関与しているシス配列であることが確認できた。

同様にして、DNA配列B (G A G A T G A G)が存在するHMT1の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片から該配列を除去することによってHMT1の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片の低温誘導性が失われるか否かについて検討した。DNA配列Aの場合と同様の方法によって、まずHMT1の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片をpT7Blue T-ベクターに挿入し、該プラスミド中のDNA配列Bの両隣に位置する配列に相補的な外向きのプライマーを用いたInverse PCRを行った後、同様の解析を行った。

プライマーの配列は以下の通りであった。

PDX3-HMT1 IGR-cis F: A A C A A C T A T T T T T A T A A C A T A T A A T T T C C C (配列番号23)

PDX3-HMT1 IGR-cis R: C T G C C T A C T G C T C A C C T T G (配列番号2

4)

なおPCRは、上記のDBP2の5'上流側非翻訳領域からシス配列を除くためのPCRと同様の条件で行った。

ノーザンブロットの分析の結果を図16に示す。完全なHMT1の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片をEGFP DNAの上流に連結した場合(図16 +cis)に比べて、前記DNA断片からDNA配列Bを除去することにより低温誘導性が失われた(図16 -cis)ことから、DNA配列Bが低温誘導に関与しているシス配列であることを確認した。

実施例6 低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片によるタンパク質の発現および他の酵母プロモーターとの比較

低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片を用いて、下流に連結した外来遺伝子を発現できることを以下のように確認した。また、その発現系としての有用性を実証するために、既知のプロモーターとの比較を行った。具体的には、HSP12の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片を用い、これをアルコール脱水素酵素(ADH1)プロモーターおよびグリセロアルデヒド三リン酸脱水素酵素(TDH3)プロモーターと比較した。下記のように同じプラスミド構造を持つ3種の発現ベクターを作製して比較した。

HSP12の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片を含むプラスミドは実施例3に記述したものをを用いた。

ADH1プロモーターを含むプラスミドは次のように作製した。まず、ADH1プロモーターを有する酵母発現ベクターpAAH5(大阪大学佐藤名誉教授より分与;Methods Enzymol. 101, 192-201 (1983))をSphIおよびHindIIIで切断し、DNA Blunting Kit(Takara)によって平滑末端化した後に、アガロース電気泳動によるDNA断片の分画を行い、ADH1プロモーターを含む断片(約400 bp)を回収した。一方、HSP12の低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片の場合と同様に、プラスミドpUG35-MET25をSalIで切断し、DNA Blunting Kitによって平滑末端化した後に、細菌アルカリホスファターゼによる脱リン酸化を行った。上記のADH1プロモーターを含む断片とプラスミドpUG35-MET25を、DNA Ligation Kit ver.2 (Takara)

を用いて連結させ、大腸菌 DH5 α に導入した。得られた形質転換体を一晚培養後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep kit を用いてプラスミドを抽出し、制限酵素の切断パターンと配列解析により、目的のプラスミドを保有した形質転換体を判別した。この形質転換体より、ADH1 プロモーターを有する発現プラスミドを調製した。

TDH3 プロモーターを含むプラスミドは次のように作製した。まず、TDH3 プロモーターを有する酵母発現ベクター pG-3 (新日本化学株式会社 長島直氏より分与; Methods Enzymol. 194, 389-398 (1991)) を BamHI および HindIII で切断し、DNA Blunting Kit を用いて平滑末端化した後に、アガロース電気泳動による DNA 断片の分画を行い、TDH3 プロモーターを含む断片 (約 660 bp) を回収した。得られた DNA 断片を、上記と同様の方法でプラスミド pUG35-MET25 の SalI 位置に挿入し、目的の構造を持つプラスミドを保有した形質転換体を選抜し、最終的に TDH3 プロモーターを有する発現プラスミドを調製した。

これら 3 種のプラスミドはプロモーター以外は同一の構造を有している。これら 3 種のプラスミドを用いて、それぞれ酵母サッカロミセス・セレビシエ YPH500 を形質転換した。得られた形質転換酵母をウラシルを含まない合成培地 (0.67% Yeast nitrogen base (アミノ酸を含まない)、2% グルコース、0.02 mg/ml 硫酸アデニン、0.02 mg/ml トリプトファン、0.02 mg/ml ヒスチジン、0.03 mg/ml ロイシン、0.03 mg/ml リシン) に植菌し、30°C で振とう培養した。ADH1 プロモーターを含む発現プラスミドで形質転換した酵母および TDH3 プロモーターを含む発現プラスミドで形質転換した酵母については、600 nm の吸光度が約 1.3 になった時点で培養液を回収した。HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含む発現プラスミドで形質転換した酵母は、600 nm の吸光度が 0.5 になった時点で培養液をフラスコごと予め 10°C に設定しておいた水浴に浸し、15 分間ゆっくりと振とうしながら急冷した。このフラスコを、予め 10°C に設定しておいた低温恒温槽に移し、10°C で振とう培養を続けた。10°C の水浴に培養液を浸した時点を 0 分として、経時的にサンプリングした。酵母からの RNA の抽出は実施例 1 と同様に行った。調製した RNA 10 μ g を用いて実施例 2 の方法によってノーザンブロット分析を行った。その結果を図 17 に示す。

図 17 の中段には、3 種類のプラスミドで形質転換した酵母の培養温度を 30℃ あるいは 30℃ から 10℃ に低下させたときの EGFP mRNA の量を示している。通常 30℃ で用いられる ADH1 プロモーターと TDH3 プロモーターから生産される EGFP mRNA 量を、30℃ から 10℃ に温度を低下させた酵母内の HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片から生産される EGFP mRNA 量と比較した結果を経時的に示している。下段には、中段の結果から ADH1 プロモーターとの比較において相対的に強かった TDH3 プロモーターについて、30℃ および、30℃ から 10℃ に温度を低下させた酵母内の HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片から生産される EGFP mRNA 量と比較した結果を経時的に示している。

この結果より、既知のプロモーターである ADH1 プロモーターまたは TDH3 プロモーターを用いたときよりも、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を用いた場合に高い EGFP mRNA レベルが得られることがわかった。

次に、ADH1 プロモーターよりも高い mRNA レベルを示した TDH3 プロモーターを対照とし、タンパク質生産レベルについて HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片と比較した。サンプリングは上記と同様に行った。サンプリング後、遠心分離によって回収した酵母は、5 mM DTT 存在下で、CellLytic™ Y (Sigma) および Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) を使用し、それぞれのマニュアルに記載された濃度となるように添加し、4℃ で 1 時間激しく攪拌して溶解させた。次いで、4℃、15,000 rpm で 10 分間遠心分離した後、上清を全タンパク質抽出液として、以後の解析に用いた。全タンパク質抽出液 30 μ g を一般的な方法（タンパク質実験ノート、岡田雅人・宮崎香編、羊土社などに記載）に従って SDS-PAGE (12.5%ゲル) に供し、マニュアルに記載された方法により分離されたタンパク質を Immobilon-P (Millipore) に転写した。その後、1000 倍希釈した抗 GFP 抗体 (Living Colors™ A. v. Peptide Antibody, Clontech) 及び、ECL PLUS Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences) を用い、それぞれのマニュアルに従ってウエスタンブロット分析を行い、EGFP タンパク質を検出した。その結果を図 18 に示す。

図 18 の下段には、TDH3 プロモーターまたは HSP12 の低温誘導性プロモーター

の機能を有する DNA 断片を含むプラスミドで形質転換した酵母の培養温度を 30℃ から 10℃ に低下させたときの EGFP タンパク質量を経時的に示している。

この結果より、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を利用して 10℃ で誘導生産させた場合に、既存の TDH3 プロモーターを用いて 30℃ で生産させた場合よりも多量のタンパク質が生産できることが示された。

実施例 7 低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含む他の発現ベクターの構築と他の酵母（サッカロミセス・セレビシエ）株によるタンパク質の発現

最初に、EGFP の前後にさまざまな制限酵素認識部位を組み込んだプラスミドを作製した。まず、プラスミド pUG35-MET25 を用い、PCR 法によって EGFP の ORF を増幅した。

プライマーの配列は以下の通りであった。

EGFP3 ORF F: A T G T C T A A A G G T G A A G A A T T A T T C A C T G G (配列番号 25)

EGFP3 ORF R: T T A T T T G T A C A A T T C A T C C A T A C C A T G G G (配列番号 26)

EGFP3 ORF F は、実施例 3 で用いたプラスミド pUG35-MET25 中 EGFP 開始コドン ATG を含む下流 29 bp であり、EGFP3 ORF R は EGFP 終止コドンを含む上流 29bp に相補的な配列であった。

PCR は、プラスミド pUG35 1 ng、アニーリング温度を 50℃ とし、30 サイクルの反応を行ったこと以外は実施例 2 の HSP12 フラグメントの増幅と同じ条件で行った。増幅した DNA を T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (TakaRa) でリン酸化した。一方、pYES2 (Invitrogen 社より購入) を EcoRI で切断したのち、DNA blunting kit を用いて平滑末端化し、さらに細菌アルカリホスファターゼで脱リン酸化した。増幅した EGFP の ORF と平滑末端化した pYES2 とを DNA Ligation Kit ver.2 を用いて連結させた後、大腸菌 DH5 α に導入した。得られた形質転換体を一晚培養後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep kit を用いてプラスミドを抽出し、制限酵素切断パターンにより、目的のプラスミドを保有した形質転換体を判別した。この形質

転換体より、プラスミド pYES2+EGFP3 を調製した。

次いで、セントロメアを複製開始点とするプラスミドを作製するために、プラスミド pYES2+EGFP3 を HpaI および MluI で切断し、約 450 bp からなる DNA 断片を回収した。一方、実施例 3 で作製した HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含む pUG35-MET25 (以下、pUG35+PHSP12 と呼ぶ) を同様に HpaI および MluI で切断し、該 pUG35+PHSP12 (約 6 kb) に上記の約 450 bp の DNA 断片を DNA ligation kit ver.2 を用いて連結し、大腸菌 DH5 α を形質転換した。得られた形質転換体を一晚培養後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep kit を用いてプラスミドを抽出し、制限酵素切断パターンにより、目的のプラスミドを保有した形質転換体を判別した。この形質転換体より、プラスミド pUG35+PHSP12+MCS を調製した。

また、2 μ を複製開始点とするプラスミドを作製するために、得られたプラスミド pUG35+PHSP12+MCS を SpeI および MluI を用いて切断し、アガロース電気泳動により発現ユニット (約 1.6 kb) の分画と回収を行った。一方、pYES2 を同じく SpeI および MluI を用いて切断し、アガロース電気泳動で pYES2 ベクター断片 (約 5.1 kb) の分画と回収を行った。上記の発現ユニットと pYES2 ベクター断片とを、Ligation Kit ver.2 を用いて連結し、大腸菌 DH5 α を形質転換した。得られた形質転換体を一晚培養後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep kit を用いてプラスミドを抽出し、制限酵素切断パターンにより、目的のプラスミドを保有した形質転換体を判別した。この形質転換体より、プラスミド pYES2+PHSP12+EGFP3 を調製した。

さらに、2 μ を複製開始点とし、弱いロイシン合成酵素遺伝子 (leu2-d) を有するプラスミドを作製するために、上記のプラスミド pUG35+PHSP12+MCS を HindIII および KpnI を用いて切断し、アガロース電気泳動により EGFP3 発現ユニットを含む DNA 断片 (約 1.7 kb) を得た。一方、pYEX-BX (AMRAD Biotech より購入) を HindIII および KpnI を用いて切断し、アガロース電気泳動により pYEX-BX ベクター断片 (約 6.3 kb) の回収を行った。上記の EGFP3 発現ユニットを含む DNA 断片と pYEX-BX ベクター断片とを、DNA Ligation Kit ver.2 を用いて連結し、大腸菌 DH5 α を形質転換した。得られた形質転換体を一晚培養後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep

kit を用いてプラスミドを抽出し、制限酵素切断パターンにより、目的のプラスミドを保有した形質転換体を判別した。この形質転換体より、プラスミド pYEX+PHSP12+EGFP3+TCYC1 を調製した。

これら 3 種のプラスミドを用いて、それぞれ酵母サッカロミセス・セレビシエ YPH500 株を形質転換した。得られた形質転換体を実施例 6 と同じくウラシルを含まない合成培地に植菌し、30℃で振とう培養した。ただし、プラスミド pYEX+PHSP12+EGFP3+TCYC1 については、弱いロイシン合成酵素遺伝子を有しているため、上記の合成培地からさらにロイシンを除いた培地を用いる実験も行った。培養、サンプリング、RNA 調製、タンパク質調製、ノーザンブロット分析および SDS-PAGE 分析はいずれも実施例 6 と同様に行った。

図 19 は、中段および下段において、これらのプラスミドで形質転換した酵母の培養温度を 30℃から 10℃に低下させたときの EGFP mRNA の量を経時的に示している。さらに下段において、pYEX-BX では培養液からロイシンを除くことの EGFP mRNA 量に及ぼす効果も示している。

ノーザンブロット分析で調べた結果、複製開始点および選択マーカーの異なる 3 種のプラスミド(いずれも HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含む)で形質転換した酵母は、いずれにおいても低温処理 (10℃) により EGFP mRNA のレベルが上昇した。

また、図 20 は、図 19 に示されたプラスミドで形質転換した酵母の培養温度を 30℃から 10℃に低下させたときの EGFP タンパク質量を経時的に示している。さらに、pYEX-BX では培養液からロイシンを除くことの EGFP タンパク質量に及ぼす効果も示している。

図 20 に示したように、2 種のプラスミド pUG35+PHSP12+MCS および pYEX+PHSP12+EGFP3+TCYC1 で形質転換した酵母中における EGFP のタンパク質発現量を SDS-PAGE 分析で調べた結果、いずれにおいても低温処理 (10℃) により EGFP タンパク質のレベルが上昇し、多量の EGFP を生産可能であることが明らかとなった。特に、leu2-d マーカーを有したプラスミドを用い、ロイシン欠損培地を用いることにより顕著な生産量を示した。

以上の検討から、低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を組み込んだ発現プラスミドは、複製開始点および選択マーカーにかかわらず、低温によるタンパク質の誘導生産が可能であることがわかった。一方、複製開始点やマーカーの選択によって、生産量を増大させることが可能であることがわかった。

次に、酵母サッカロミセス・セレビシエの異なる株を用いたタンパク質発現を行った。異なる株として、YPH499 株、YPH501 株 (Stratagene 社より購入)、SHY3 株、KK4 株 (大阪大学佐藤名誉教授より分与)、EGY48 株 (Takara 社より購入)、BY4741 株、BY4742 株、BY4743 株 (Research Genetics 社より購入) を用いた。これらの酵母株を発現プラスミド pYEX+PHSP12+EGFP3+TCYC1 で形質転換し、実施例 3 と同様にそれぞれウラシルを除く必要なアミノ酸を加えた合成培地で生育させ、細胞内タンパク質を調製し、SDS-PAGE で分析した。図 2 1 に pYEX+PHSP12+EGFP3+TCYC1 で形質転換した様々な株における培養温度を 30℃ から 10℃ に低下させたときの EGFP タンパク質量を示す。

全ての酵母株で EGFP の発現が観察されたことから、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片は、酵母株によらず機能することが明らかとなった。また、特に EGY48 株と BY4743 株を用いた場合に EGFP の高い生産量が得られた。

実施例 8 低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含む発現ベクターと既存の発現ベクターとの発現量の比較

ガラクトース誘導型 GAL1 プロモーターを有する pYES2 および重金属誘導型 CUP1 プロモーターを有する pYEX-BX と、上記の HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含む発現プラスミド pYEX+PHSP12+EGFP3+TCYC1 (以下、pLTex221+EGFP3 と呼ぶ) の EGFP 発現量を、それぞれの推奨誘導条件において比較した。EGFP を含む pYES2 については、実施例 7 で作製したプラスミド pYES2+EGFP3 を用いた。EGFP を含む pYEX-BX については、以下のように調製した。上記のプラスミド pYES2+EGFP3 を Bam HI および Xho I で切断し、アガロース電気泳動により EGFP3 の ORF 約 780 bp の分画と回収を行った。一方、pYEX-BX を、Sal I および Bam HI で切断した。得られた EGFP3 の ORF と pYEX-BX とを、DNA Ligation

Kit ver. 2 を用いて連結し、大腸菌 DH5 α を形質転換した。得られた形質転換体を一晩培養後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep kit を用いてプラスミドを抽出し、制限酵素切断パターンにより、目的のプラスミドを保有した形質転換体を判別した。この形質転換体より、プラスミド pYEX-BX+EGFP3 を調製した。これら 3 種 (pYES2+EGFP3、pYEX-BX+EGFP3、pLTex221+EGFP3) を用いて、酵母サッカロミセス・セレビシエ YPH500 株を形質転換した。得られた形質転換体を実施例 6 と同様な方法で培養、サンプリング、タンパク質調製および SDS-PAGE 分析を行った。SDS-PAGE 分析の結果を図 2 2 に示す。

図 2 2 に示すように、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含む発現ベクター pLTex221+EGFP3 は、pYES2+EGFP3 および pYEX-BX+EGFP3 よりも EGFP3 を多量に生産した。この結果より、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含む発現ベクターが既存の発現ベクターよりも優れていることが明らかとなった。

実施例 9 低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含む発現ベクターを用いた場合の低温誘導条件

実施例 7 で作製したプラスミド pYEX+PHSP12+EGFP3+TCYC1 (pLTex221+EGFP3) を用いて形質転換した酵母サッカロミセス・セレビシエ YPH500 株を用いて、低温誘導条件の検討を行った。本形質転換酵母を実施例 8 と同様な方法で培養、サンプリング、タンパク質の調製および SDS-PAGE を行った。低温暴露は 4℃、10℃および 20℃で行い、サンプリングは 0、6、12、24、48、72 および 96 時間後に行った。SDS-PAGE 分析の結果を図 2 3 に示す。

図 2 3 に示すように、4℃、10℃および 20℃のいずれの温度を用いた場合にも EGFP タンパク質の生産が見られた。このことから、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を用いた低温誘導タンパク質生産は 10℃での低温処理のみならず、4℃あるいは 20℃でも可能であることがわかった。

実施例 10 サッカロミセス・セレビシエ以外の酵母における低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を用いたタンパク質生産

低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片がサッカロミセス・セレビシ

エ以外の酵母においても機能するか否かを調べるために、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片および EGFP3 の ORF をメタノール酵母ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) に導入した。

まず、実施例 7 で作製した pUG35+PHSP12+MCS を Bam HI と Kpn I で切断し、アガロース電気泳動により HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片、EGFP3 の ORF および CYC1 ターミネーターを含む DNA 断片約 1.7 kb の分画と回収を行った。一方、ピキア・パストリス用プラスミド pPICZ-B (Invitrogen 社より購入) を Bam HI と Kpn I で切断し、AOX1 ターミネーターを除くプラスミド本体約 3.0 kb をアガロース電気泳動により分画および回収した。上記の DNA 断片と AOX1 ターミネーターを除くプラスミド pPICZ-B とを DNA Ligation Kit ver.2 を用いて連結し、大腸菌 DH5 α を形質転換した。得られた形質転換体を一晚培養後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep kit を用いてプラスミドを抽出し、制限酵素切断パターンにより、目的のプラスミドを保有した形質転換体を判別した。この形質転換体より、プラスミド pPICZ+PHSP12+EGFP3+TCYC1 を調製した。このプラスミド pPICZ+PHSP12+EGFP3+TCYC1 を用いて、イージーセレクト *Pichia* 発現キット (Invitrogen 社) のマニュアルに従い、ピキア・パストリス GS115 株を形質転換した。次いで、4 mg/ml Zeocin に耐性がある株を選抜した。得られた形質転換体を YPED 培地に植菌し、30°C で 600 nm の吸光度が 2.2 となるまで培養した。次いで、実施例 6 と同様な方法で 10°C に培養温度を低下させ、3 日後および 10 日後にサンプリングした。タンパク質調製およびウエスタンブロット分析は実施例 6 と同様な方法で行った。ウエスタンブロット分析の結果を図 24 に示す。図 24 は、形質転換したピキア・パストリスを 30°C で培養した後に、培養温度を 30°C から 10°C に低下させて 3 日後および 10 日後の EGFP タンパク質の発現を示している。

図 24 に示すように、メタノール酵母ピキア・パストリスの培養温度を低下させることにより EGFP タンパク質が誘導生産された。この結果より、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を用いた低温誘導発現はサッカロミセス・セレビシエだけでなく、他の酵母でも可能であることが示された。

実施例 11 低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片による EGFP 以外の

タンパク質の発現

低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を用いて、EGFP 以外のタンパク質を発現できることを、以下のように確認した。具体的には、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を用い、このプロモーターの下流に不凍タンパク質の一種である RD3 (J. Biol. Chem. 276, 1304-1310 (2001)) の cDNA を連結し、その発現をウエスタンブロット分析により確認した。なお、RD3 タンパク質は、大腸菌を宿主とする発現系を用いた 37°C での発現では不溶化した。

RD3 の発現プラスミドは次のように作製した。まず、RD3 の ORF を含むプラスミド pET20b/RD3 (当研究所西宮佳志氏より分与) を、NdeI および EcoRI で切断し、DNA Blunting Kit によって平滑末端化した後に、アガロース電気泳動による DNA 断片の分画を行い、RD3 の ORF を含む DNA 断片(約 400 bp)を回収した。一方、実施例 3 で作製したプラスミド pUG35-MET25 を HpaI および MluI で切断し、アガロース電気泳動による DNA 断片の分画を行い、約 5.4 kb のベクター断片を回収した。同様に、実施例 7 で作製した pYES2+EGFP3 を HpaI および MluI で切断し、約 450 bp からなる断片をアガロース電気泳動による分画、および回収を行った。得られた上記のベクター断片と約 450bp からなる断片とを DNA Ligation Kit ver.2 を用いて連結させた後、大腸菌 DH5a に導入した。得られた形質転換体を一晚培養後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep Kit を用いてプラスミドを抽出し、制限酵素切断パターンにより目的のプラスミドを保有した形質転換体を判別した。この形質転換体より、目的のプラスミド pUG35-MET25+MCS を調製した。このプラスミド pUG35-MET25+MCS を EcoRI および NotI で切断し、DNA Blunting Kit によって平滑末端化した後に、細菌アルカリホスファターゼによる脱リン酸化を行った。その後、アガロース電気泳動により、ベクター断片(約 5.1 kb)を回収した。上記の RD3 の ORF を含む DNA 断片とベクター断片を、DNA Ligation Kit ver.2 を用いて連結させ、大腸菌 DH5α に導入した。得られた形質転換体を一晚培養後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep Kit を用いてプラスミドを抽出し、制限酵素の切断パターンと配列解析により、目的のプラスミドを保有した形質転換体を判別した。この形質転換体より、RD3 の ORF を有するプラスミド pUG35-MET25+MCS+RD3 を調製した。

次いで、さらに HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含むプラスミドを作製した。まず、実施例 4 の方法に従い HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を PCR 法により増幅し、末端を T4 ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化した後に、アガロース電気泳動による DNA 断片の分画を行い、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片(約 610 bp)を回収した。一方、pUG35-MET25+MCS+RD3 を SpeI で切断した後、DNA Blunting Kit によって平滑末端化した後に、細菌アルカリホスファターゼによる脱リン酸化を行った。上記の HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片とベクター断片とを、DNA Ligation Kit ver.2 を用いて連結させ、大腸菌 DH5 α に導入した。得られた形質転換体を一晚培養後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep Kit を用いてプラスミドを抽出し、制限酵素の切断パターンと配列解析により、目的のプラスミドを保有した形質転換体を判別した。この形質転換体より、最終的に HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含む発現プラスミドを調製した。

また、TDH3 プロモーターを含むプラスミドを次のように作製した。まず、TDH3 プロモーターを含む酵母発現ベクター pG-3 を BamHI および HindIII で切断し、DNA Blunting Kit によって平滑末端化した後に、アガロース電気泳動による DNA 断片の分画を行い、TDH3 プロモーターを含む断片(約 660 bp)を回収した。得られた DNA 断片を、上記と同様の方法で pUG35-MET25+MCS+RD3 の SpeI 部位に挿入し、目的の構造を持つプラスミドを保有した形質転換体を、制限酵素の切断パターンと配列解析により選抜し、最終的に TDH3 プロモーターを含む発現プラスミドを調製した。

これら 2 種類のプラスミドは、プロモーター以外は同一の構造を有している。これら 2 種類のプラスミドを用いて、それぞれ酵母サッカロミセス・セレビシエ YPH500 株を形質転換した。得られた形質転換体をウラシルを含まない合成培地に植菌し、30℃で振とう培養した。TDH3 プロモーターを含む発現プラスミドで形質転換した酵母については、600 nm における吸光度が 0.7 になった時点で培養液を回収した。HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を含む発現

プラスミドで形質転換した酵母については、600 nm における吸光度が 1.0 になった時点で低温処理を開始した以外は、実施例 6 と同じ実験方法で培養およびサンプリングを行った。ウエスタンブロット分析では、5000 倍希釈した抗 RD3-N1 抗体 (RD3 のサブユニットを認識する抗体、株式会社ホクドーに依頼して作製したもの) を用いた。形質転換した酵母を、それぞれ 30℃ から 10℃ に低下させた温度または 30℃ で培養した場合の RD3 タンパク質の発現量を示すウエスタンブロット分析の結果を図 25 に示す。この結果より、大腸菌発現系では不溶化する RD3 タンパク質も、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を利用して 10℃ で誘導生産させた場合にほとんどが可溶性タンパク質として生産された。さらに既存の TDH3 プロモーターを用いて 30℃ で生産させた場合よりも HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を利用することで、多量のタンパク質を生産できることが確認できた。

次に、RD3 と同様に ECFP および DsRed を発現させた。なお、ECFP および DsRed を融合タンパク質ではなく、本来のタンパク質として生産させるために、それぞれ pECFP および pDsRed-Express (いずれもクロンテック社より購入) から本来のタンパク質をコードする ORF 領域を PCR 法によって増幅し、発現ベクター pTrc99A (ファルマシア社より購入) に導入した。これらの発現プラスミドを用いて大腸菌を形質転換したが、蛍光タンパク質に由来する蛍光は観察されなかった。

まず、マルチクローニングサイトを有する低温誘導発現ベクター pLTex321 の構築を行った。pUG35-MET25+MCS を ClaI および XhoI で切断し、アガロース電気泳動により、ベクター断片 (約 5.1 kbp) を回収した。一方、このベクター断片を環状化させるため、下記のオリゴ DNA を合成し、リンカーとして用いた。

MCS リンカー-F: CCGCTCGAGCGGCCGCGAGCTCGTCGACATCGATGG (配列番号 27)

MCS リンカー-R: CCATCGATGTCGACGAGCTCGCGGCCGCTCGAGCGG (配列番号 28)

該リンカー DNA は、XhoI-NotI-SacI-SalI-ClaI の制限酵素サイトを含んでいる。両オリゴ DNA をアニーリングした後、XhoI および ClaI で該リンカー DNA の両末端

を切断した。上記のベクター断片とリンカーDNA とを、DNA Ligation Kit ver.2 を用いて連結させ、大腸菌 DH5 α に導入した。得られた形質転換体を一晚培養後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep Kit を用いてプラスミドを抽出し、制限酵素の切断パターンと配列解析により、目的のプラスミドを保有した形質転換体を判別した。この形質転換体より目的のプラスミドを調製した。

得られたプラスミドは、さらに、SpeI および BamHI で切断し、アガロース電気泳動でベクター断片(約 5.1 kb)を回収した。得られたベクター断片に HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を導入するため、下記のプライマーを用いた PCR により、SpeI 認識配列および BamHI 認識配列を含む HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を増幅した。PCR は、実施例 2 における HSP12 フラグメントの増幅条件と同様に行った。

-610-HSP12 IGR SpeI F: G G A C T A G T G A T C C C A C T A A C G G C C C A G (配列番号 29)

-610-HSP12 IGR BamHI R: C G G G A T C C T G T T G T A T T T A G T T T T T T T T G T T T T G A G (配列番号 30)

その後、SpeI および BamHI で切断処理した後、アガロース電気泳動によって分離し、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片(約 600 bp)を回収した。

上記のベクター断片と HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片を DNA Ligation Kit ver.2 を用いて連結させ、大腸菌 DH5 α に導入した。得られた形質転換体を一晚培養後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep Kit を用いてプラスミドを抽出し、制限酵素の切断パターンと配列解析により、目的のプラスミドを調製した。

得られたプラスミドを SpeI および KpnI で切断し、アガロース電気泳動により、HSP12 の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片、マルチクローニングサイトおよび CYC1 ターミネーターを含む DNA 断片 (約 1 kb)を回収した。同様に pYEX-BX 発現ベクターを SpeI および KpnI で切断し、アガロース電気泳動により、ベクター断片(約 6.4 kb)を回収した。上記の HSP12 の低温誘導性プロモーターの

機能を有する DNA 断片、マルチクローニングサイトおよび CYC1 ターミネーターを含む DNA 断片とベクター断片とを、DNA Ligation Kit ver. 2 を用いて連結させ、大腸菌 DH5 α に導入した。得られた形質転換体を一晚培養後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep Kit を用いてプラスミドを抽出し、制限酵素の切断パターンと配列解析により、発現ベクター pLTex321 を調製した。

一方、ECFP の発現プラスミドは次のように作製した。まず、プラスミド pECFP から ECFP の ORF を PCR により調製した。

プライマーの配列は以下の通りであった。

BAMCFP1: A A A A G G A T C C A A A A A A A T G G T G A G C A A G G G C G
A G G A G (配列番号 3 1)

HNDCFP2: T T T T A A G C T T T T A C T T G T A C A G C T C G T C C A T
(配列番号 3 2)

BAMCFP1 は、5' 側から順に 4 塩基の A、Bam HI 認識配列、6 塩基の A、および pECFP 中の ECFP の ORF の開始コドンから下流 21 bp を含む。また、HNDCFP2 は、5' 側から順に 4 塩基の T、HindIII 認識配列、ECFP の ORF の終止コドンから上流 21 塩基に相補的な配列を含む。

PCR は、pECFP 1ng、各々のプライマー 300nM、dNTP 200 μ M、MgSO₄ 1 mM ならびに KOD -Plus-用の 1xPCR バッファー(東洋紡社)および KOD -Plus- DNA ポリメラーゼ 1 U を含む反応溶液 50 μ l を用いて、第 1 ステップ: 94°C で 2 分、第 2 ステップ: 94°C で 15 秒(変性)、45°C で 30 秒(アニーリング)および 68°C で 1 分(伸長)のサイクルを 30 サイクルで行った。次いで、増幅された DNA を Bam HI および HindIII で切断した。一方、上記のように作製した発現ベクター pLTex321 を Bam HI および HindIII で切断した。上記の PCR により増幅された ECFP の ORF と pLTex321 ベクター断片とを、Ligation High(東洋紡社)を用いて連結させ、大腸菌 DH5 α に導入した。得られた形質転換体を一晚培養後、QuantumPrep Plasmid MiniPrep Kit を用いてプラスミドを抽出し、制限酵素の切断パターンと配列解析により、目的のプラスミドを保有した形質転換体を判別した。この形質転換体より、ECFP を有するプラスミド pLTex321+ECFP を調製した。

一方、DsRed については、プライマーとして下記のものを用い、PCR 用の鋳型として pDsRed-Express を用いたこと以外は上記の ECFP と同じ条件で pLTex321+DsRed を作製した。

プライマーの配列は以下の通りであった。

BAMRED1: A A A A G G A T C C A A A A A A A T G G C C T C C T C C G A G G
A C G T C (配列番号 3 3)

HNDRED2: A A A A A A G C T T C T A C A G G A A C A G G T G G T G G C G
(配列番号 3 4)

BAMRED1 は、5' 側から順に 4 塩基の A、Bam HI 認識配列、6 塩基の A、pDsRed-Express 中の DsRed の ORF の開始コドンから下流 21 bp を含む。また、HNDRED2 は、5' 側から順に 4 塩基の A、HindIII 認識配列、DsRed の ORF の終止コドンから上流 21 塩基に相補的な配列を含む。

このように作製した 2 種類のプラスミドを用いて、それぞれ酵母サッカロミセス・セレビシエ YPH500 株を形質転換した。得られた形質転換体をウラシルとロイシンを含まない合成培地中で 30℃で振とう培養し 600 nm の吸光度がおよそ 0.9 になった時点で 10℃で低温処理し、10℃で 24 時間培養を続けた。蛍光タンパク質の発現は、UV ランプ(356 nm)による蛍光にて確認した。その結果を図 2 6 に示す。図 2 6 に示されるように、ECFP 発現酵母、DsRed 発現酵母はいずれにおいても生産された蛍光タンパク質による強い蛍光が観察された。

本明細書中に引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明により酵母の低温誘導性プロモーターの機能を有する DNA 断片が提供される。本発明に係る DNA 断片は、低温によるタンパク質の製造および RNA の生産制御に使用できる点で有用である。本発明により、従来発現が困難であったタンパク質の生産など、低温の利点を生かした新規なタンパク質生産系が開発される。また、本発明により、低温誘導性の分子機構の解明が前進すると考えられる。

請求の範囲

1. 以下の表に記載されるサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の遺伝子からなる群から選ばれる1つの遺伝子の5' 上流側の非翻訳領域に存在し、低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片。

表

番号	系統的 遺伝子 名	番号	系統的 遺伝子 名	番号	系統的 遺伝子 名	番号	系統的 遺伝子 名	番号	系統的 遺伝子 名
1	YAL014C	53	YDR184C	105	YGR008C	157	YKL224C	209	YNR071C
2	YAL015C	54	YDR219C	106	YGR043C	158	YKR049C	210	YNR075W
3	YAL025C	55	YDR253C	107	YGR053C	159	YKR075C	211	YNR076W
4	YAL034C	56	YDR256C	108	YGR088W	160	YKR077W	212	YOL002C
5	YBL048W	57	YDR262W	109	YGR102C	161	YKR100C	213	YOL016C
6	YBL049W	58	YDR306C	110	YGR154C	162	YLL055W	214	YOL084W
7	YBL054W	59	YDR336W	111	YGR197C	163	YLL056C	215	YOL101C
8	YBL056W	60	YDR346C	112	YGR222W	164	YLR009W	216	YOL108C
9	YBL065W	61	YDR387C	113	YGR223C	165	YLR145W	217	YOL116W
10	YBL078C	62	YDR398W	114	YGR251W	166	YLR149C	218	YOL124C
11	YBR016W	63	YDR435C	115	YGR256W	167	YLR164W	219	YOL127W
12	YBR018C	64	YDR453C	116	YGR262C	168	YLR251W	220	YOL132W
13	YBR024W	65	YDR471W	117	YGR286C	169	YLR252W	221	YOL153C
14	YBR034C	66	YDR492W	118	YGR294W	170	YLR266C	222	YOL154W
15	YBR045C	67	YDR496C	119	YHL016C	171	YLR311C	223	YOL161C
16	YBR047W	68	YDR504C	120	YHL021C	172	YLR312C	224	YOL162W
17	YBR050C	69	YDR516C	121	YHL036W	173	YLR327C	225	YOL163W
18	YBR072W	70	YDR530C	122	YHL046C	174	YLR413W	226	YOL165C
19	YBR116C	71	YDR542W	123	YHR066W	175	YLR421C	227	YOR019W
20	YBR117C	72	YEL011W	124	YHR087W	176	YML004C	228	YOR031W
21	YBR126C	73	YEL039C	125	YHR138C	177	YML128C	229	YOR043W
22	YBR148W	74	YEL072W	126	YHR139C	178	YML131W	230	YOR095C
23	YBR199W	75	YER020W	127	YHR141C	179	YMR030W	231	YOR292C
24	YBR223C	76	YER042W	128	YHR146W	180	YMR090W	232	YOR298W
25	YBR296C	77	YER053C	129	YIL036W	181	YMR100W	233	YOR391C
26	YBR297W	78	YER056C	130	YIL045W	182	YMR105C	234	YOR394W
27	YBR298C	79	YER065C	131	YIL069C	183	YMR107W	235	YPL004C
28	YBR301W	80	YER066W	132	YIL077C	184	YMR139W	236	YPL014W
29	YCL051W	81	YER067W	133	YIL107C	185	YMR246W	237	YPL015C
30	YCR005C	82	YER078C	134	YIL136W	186	YMR255W	238	YPL043W

31	YCR072C	83	YER079W	135	YIL143C	187	YMR258C	239	YPL054W
32	YCR107W	84	YER117W	136	YIL153W	188	YMR262W	240	YPL093W
33	YDL022W	85	YER150W	137	YJL132W	189	YMR271C	241	YPL107W
34	YDL024C	86	YFL014W	138	YJL155C	190	YMR316W	242	YPL122C
35	YDL031W	87	YFL030W	139	YJL223C	191	YMR320W	243	YPL149W
36	YDL037C	88	YFL055W	140	YJR085C	192	YMR322C	244	YPL171C
37	YDL039C	89	YFL056C	141	YJR155W	193	YNL011C	245	YPL186C
38	YDL059C	90	YFL057C	142	YKL026C	194	YNL024C	246	YPL223C
39	YDL070W	91	YFR014C	143	YKL070W	195	YNL112W	247	YPL224C
40	YDL075W	92	YFR015C	144	YKL071W	196	YNL117W	248	YPL245W
41	YDL113C	93	YFR017C	145	YKL078W	197	YNL124W	249	YPL250C
42	YDL115C	94	YFR053C	146	YKL087C	198	YNL141W	250	YPL280W
43	YDL125C	95	YGL029W	147	YKL089W	199	YNL142W	251	YPL281C
44	YDL169C	96	YGL033W	148	YKL090W	200	YNL178W	252	YPL282C
45	YDL204W	97	YGL045W	149	YKL091C	201	YNL194C	253	YPR045C
46	YDL243C	98	YGL075C	150	YKL094W	202	YNL195C	254	YPR061C
47	YDR003W	99	YGL122C	151	YKL103C	203	YNL213C	255	YPR086W
48	YDR018C	100	YGL135W	152	YKL125W	204	YNL244C	256	YPR121W
49	YDR056C	101	YGL179C	153	YKL150W	205	YNL331C	257	YPR143W
50	YDR070C	102	YGL184C	154	YKL151C	206	YNR039C	258	YPR160W
51	YDR111C	103	YGL255W	155	YKL162C	207	YNR051C	259	YPR200C
52	YDR174W	104	YGL261C	156	YKL187C	208	YNR053C		

2. 以下の(a)又は(b)のDNAを含む、低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片。

(a) 請求の範囲1に記載のDNA断片において1若しくは複数の塩基が欠失、置換若しくは付加されたDNA

(b) 請求の範囲1に記載のDNA断片に相補的な塩基配列からなるDNA断片とストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA

3. 以下の(a)及び/又は(b)のシス配列を含み、低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片。

(a) DNA配列A : G C T C A T C G

(b) DNA配列B : G A G A T G A G

4. 以下の(a)又は(b)のDNAを含む、低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片。

(a) 請求の範囲 3 に記載の DNA 断片において 1 若しくは複数の塩基が欠失、置換若しくは付加された DNA

(b) 請求の範囲 3 に記載の DNA 断片に相補的な塩基配列からなる DNA 断片とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする DNA

5. 請求の範囲 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の DNA 断片を含む発現ベクター。

6. 上記 DNA 断片の下流に外来遺伝子又は外来 DNA 断片を含むことを特徴とする請求の範囲 5 に記載の発現ベクター。

7. 請求の範囲 5 又は 6 に記載の発現ベクターによって形質転換された形質転換体。

8. 宿主が酵母である、請求の範囲 7 に記載の形質転換体。

9. 請求の範囲 7 または 8 に記載の形質転換体を培養温度を低下させて培養することを特徴とするタンパク質の製造方法。

10. 培養温度が 10℃ 以下である、請求の範囲 9 に記載のタンパク質の製造方法。

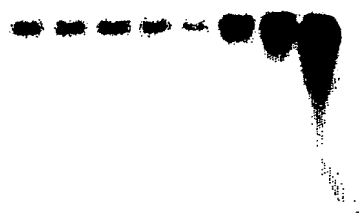
11. 請求の範囲 7 または 8 に記載の形質転換体を培養温度を低下させて培養することを特徴とする RNA 生産制御方法。

12. 培養温度が 10℃ 以下である、請求の範囲 11 に記載の RNA 生産制御方法。

図 1

培養時間 (h)

0 0.25 0.5 1.0 2.0 4.0 8.0 12.0



プローブ : HSP12

図 2

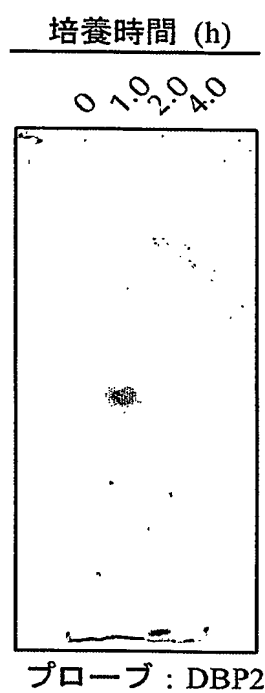


図 3

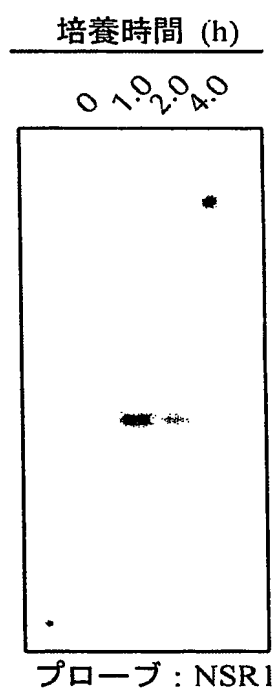


図 4

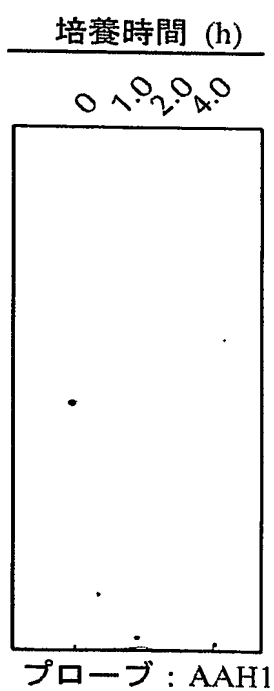


図 5

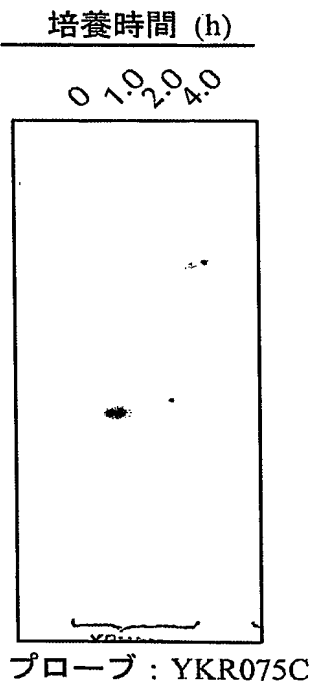


図 6

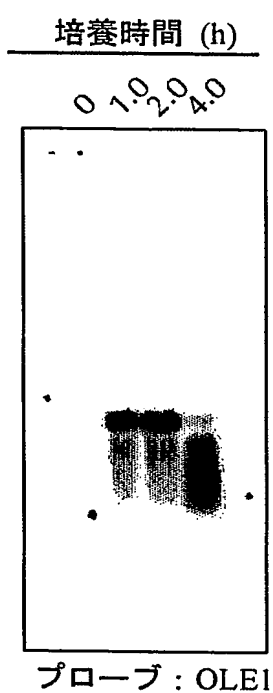


図 7

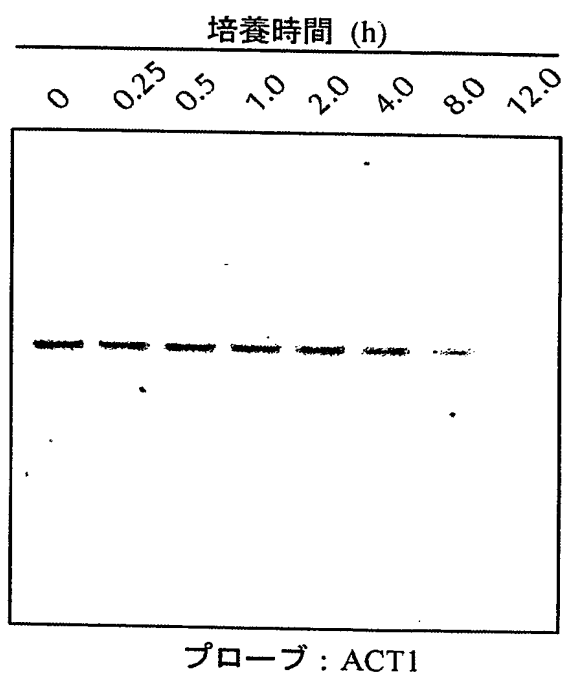


図 8

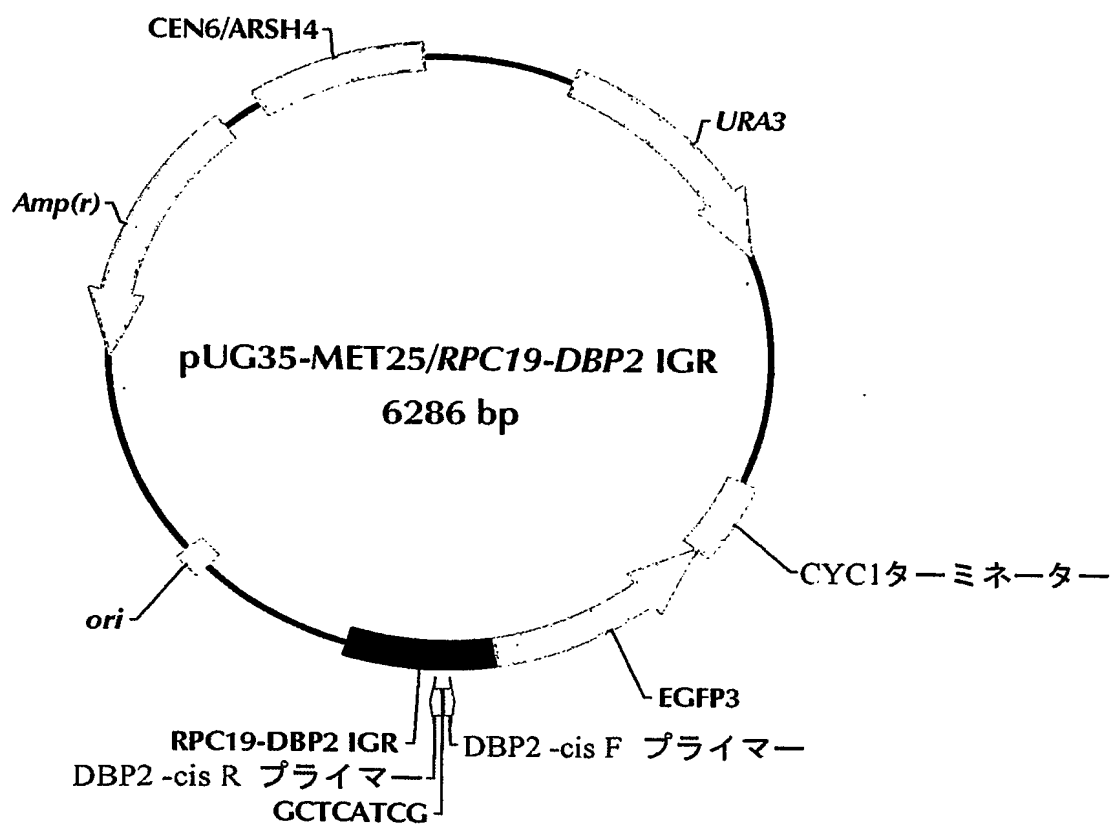


図 9

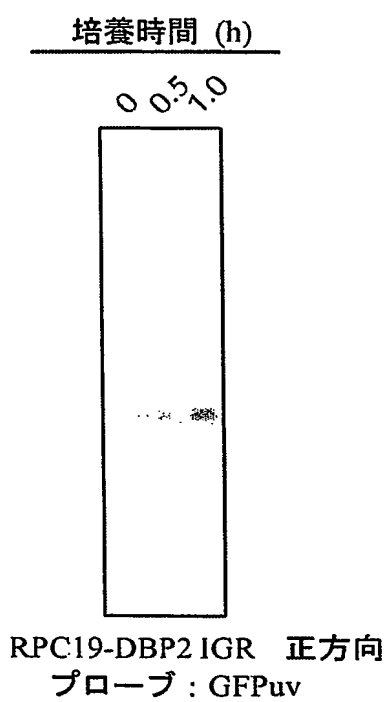


図 10

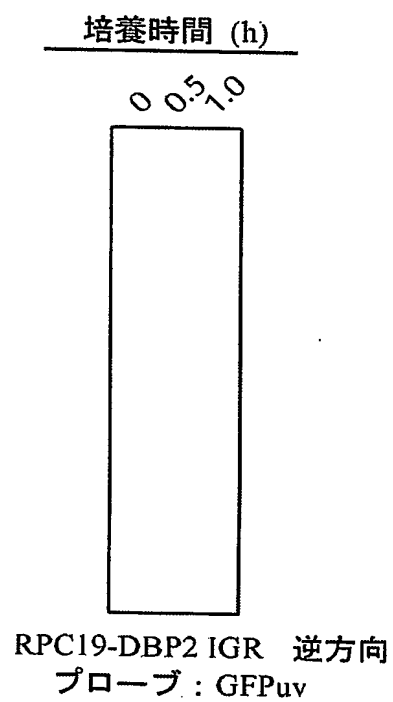


図 1 1

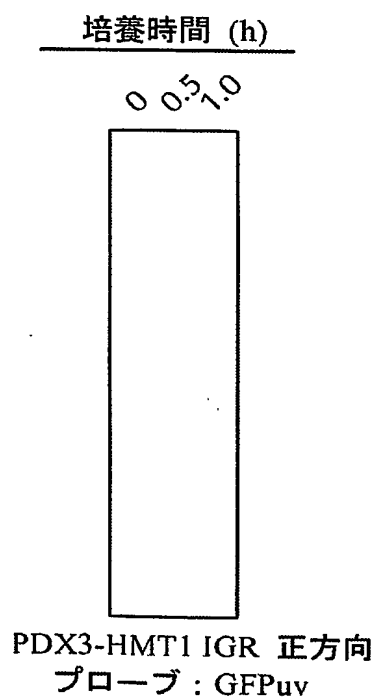


図 1 2

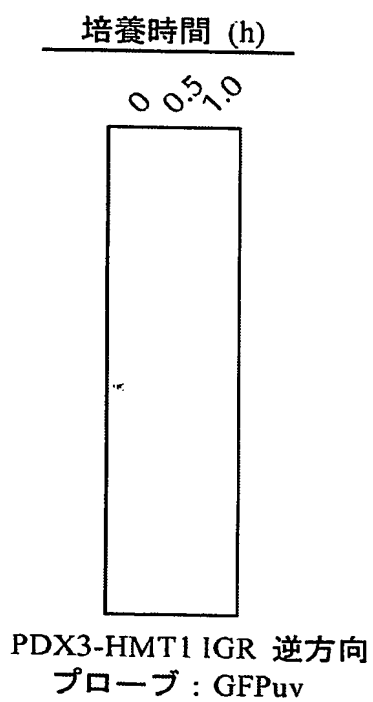
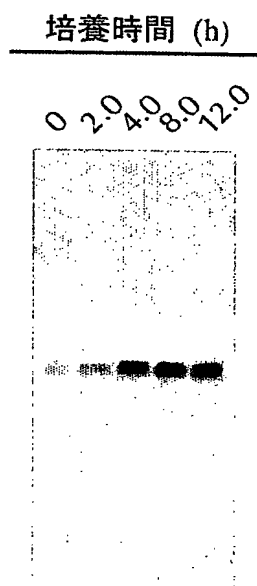


図 1 3



-610 HSP12 IGR 正方向
プローブ: GFPuv

図 1 4

培養時間 (h)

0 2.0 4.0 8.0 12.0



-610 HSP12 IGR 逆方向
プローブ: GFPuv

図 1 5

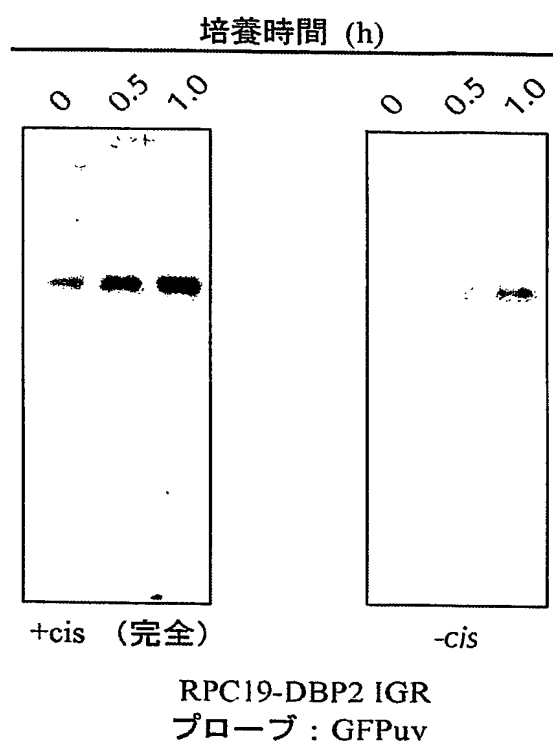


図 1 6

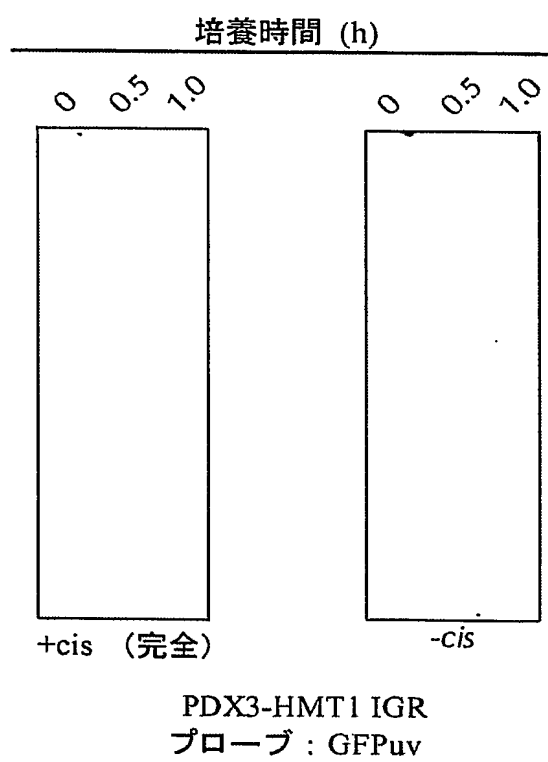


図 17

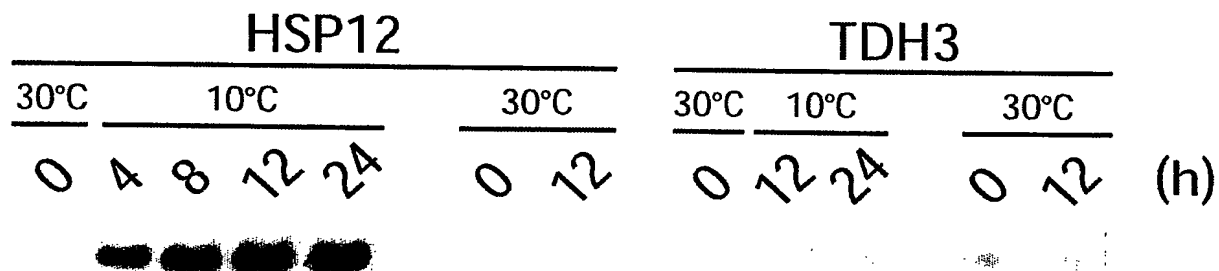
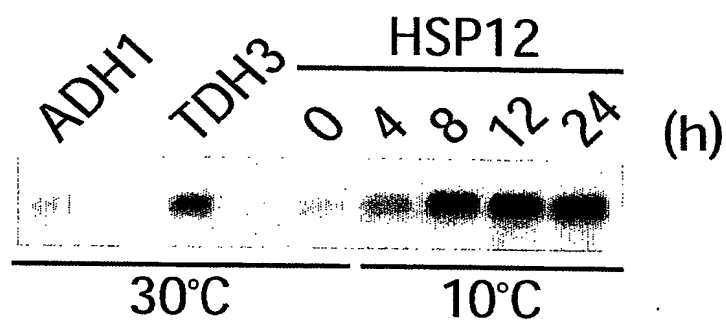
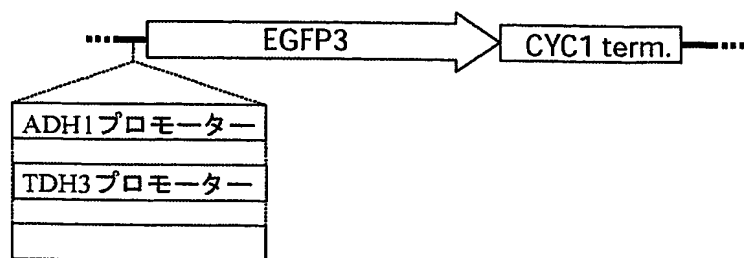
全 RNA : 10 μ g

図 18

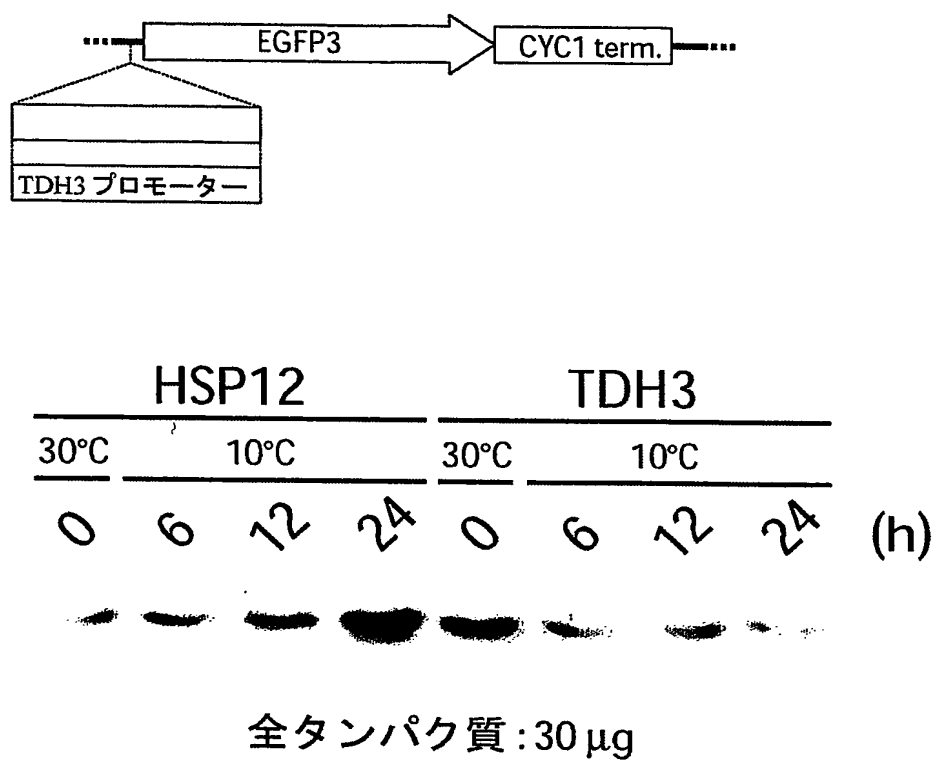


図 19

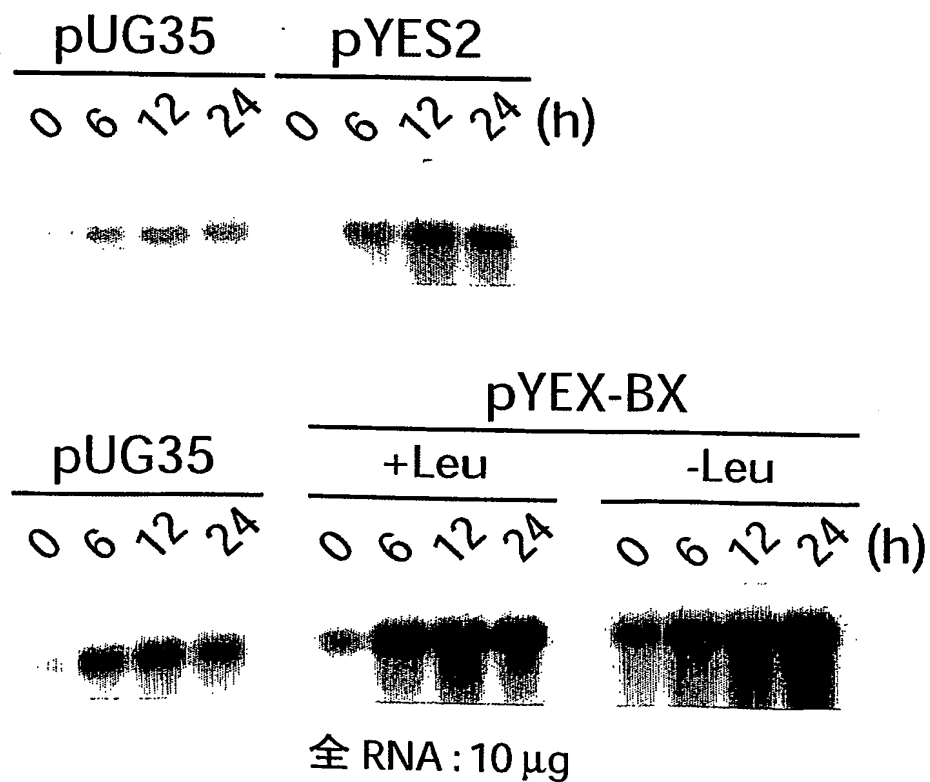
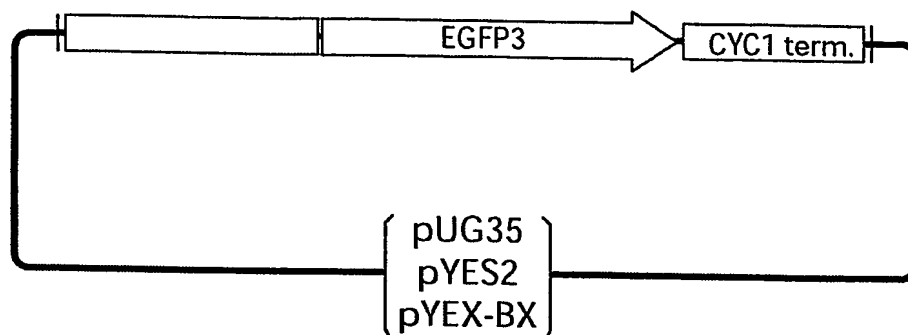
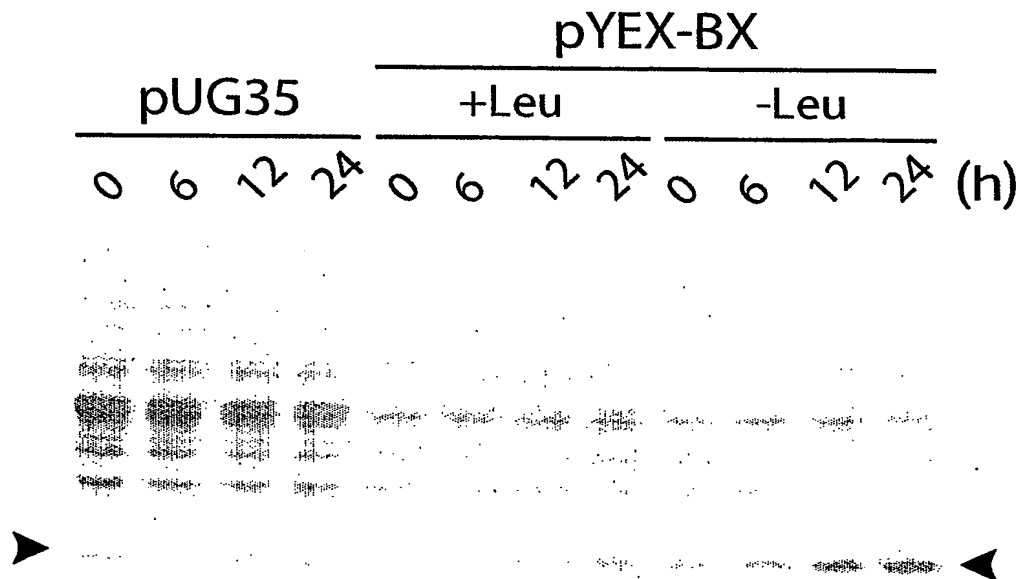
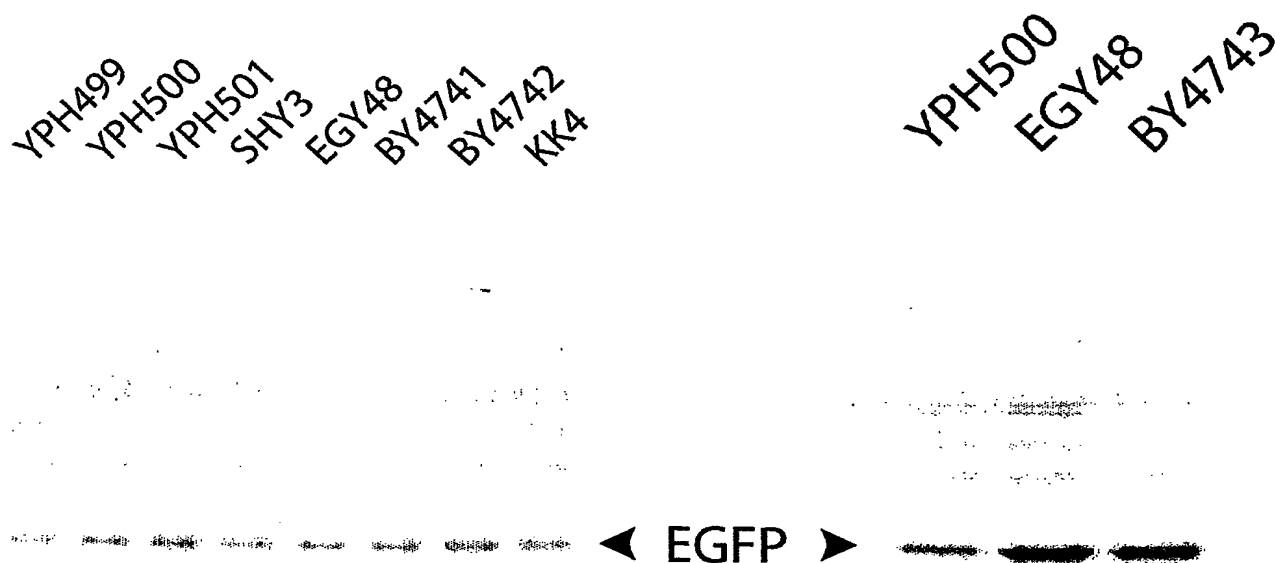


図 20



全タンパク質:10 µg

図 2 1



全タンパク質:2 μg

図 2 2

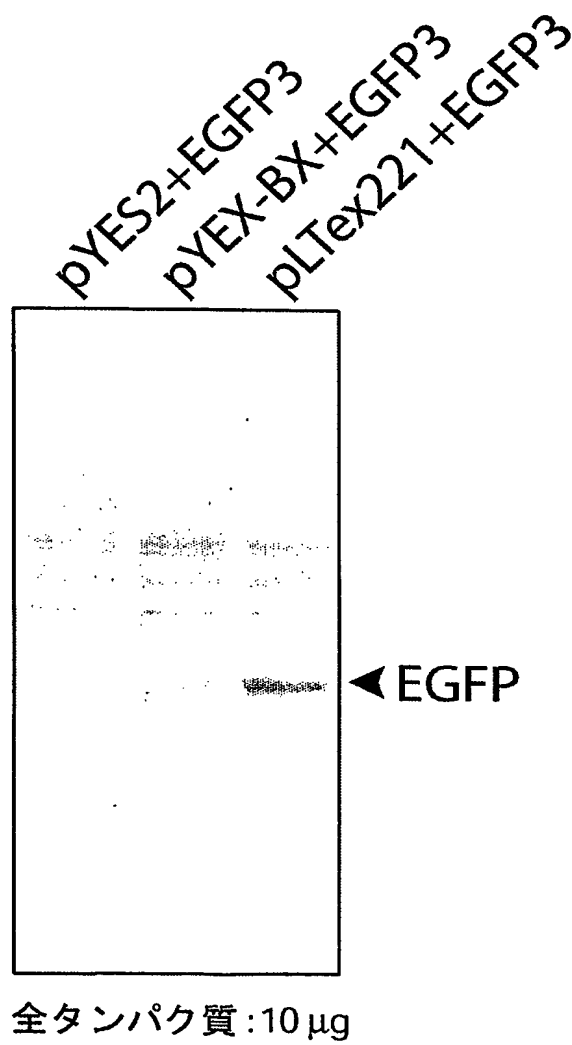


図 2 3

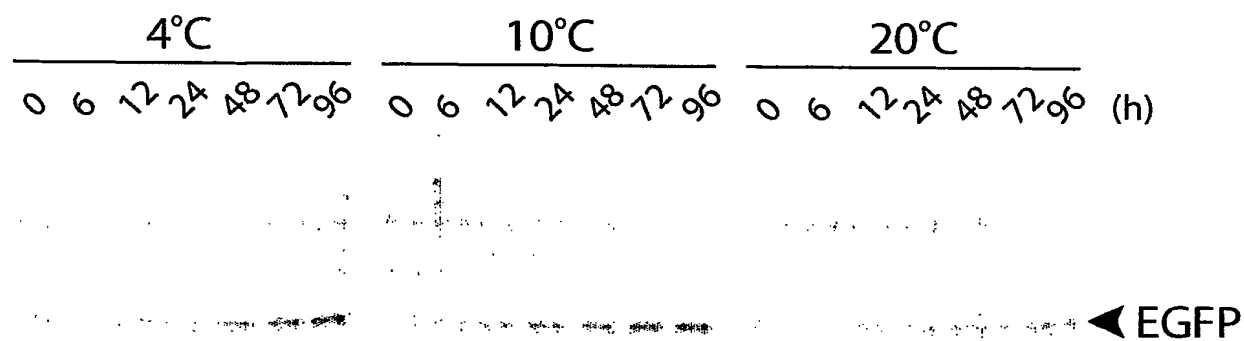
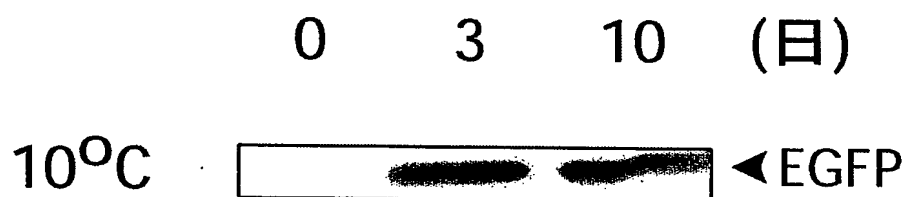
全タンパク質: 2 μ g

図 2 4



全タンパク質 : 10 μ g

図 2 5

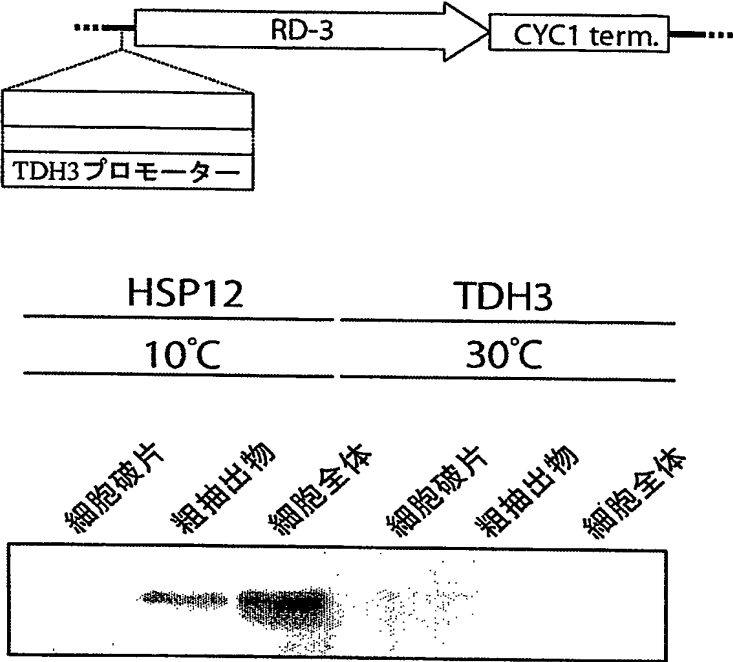


図 26



ECFP

DsRed

SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> YEAST DERIVED PROMOTERS, AND THE VECTORS AND EXPRESSION SYSTEMS USING THE PROMOTERS

<130> PH-1812-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2002-191383

<151> 2002-06-28

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 1

atgtctgacg caggtagaaa ag

22

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

ttacttcttg gttgggtctt cttc

24

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

ggatgactta cggtggtaga gatc

24

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

aagatacctc tggcggccac

20

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

ggtaacaaga aggaagttaa ggcttc

26

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

tgttttcttt gaaccagcga aag

23

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

ggtttctgtg gagtttttac aggag

25

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

gcgaatattt agtgactact tcgtcc

26

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

tggacgatac aataatttcg tacca

25

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

caacctgggtt cctataaaaa atgtctt

27

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

ggaagcttat gccaaacttct ggaactacta tt

32

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

ggaagctttt aaaagaactt accagtttcg tag

33

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

tcaaaaagac tcctacgttg gtgatgaagc

30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

catacgcgca caaaagcaga gattagaaac

30

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15

atgttacgga tcgactcaaa gacc

24

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

atttgctcta aatttgcctt aatagtgc

28

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17

gggactgtta atgaaaaatt caatg

25

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18

tattttcttt ggatgaattt gtcgg

25

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19

gatcccacta acggcccag

19

<210> 20

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

tgttgatatt agtttttttt gttttgag

28

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 21

cagaaaattt ttccttcagt ttatttg

27

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 22

atcggcgtaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

30

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 23

aacaactatt tttataacat ataatttccc

30

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 24

ctgcctactg ctcaccttg

19

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 25

atgtctaaag gtgaagaatt attcactgg

29

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 26

ttattgtac aattcatcca taccatggg

29

<210> 27

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 27

ccgctcgagc ggccgcgagc tcgtcgacat cgatgg

36

<210> 28

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 28

ccatcgatgt cgacgagctc gcggccgctc gagcgg

36

<210> 29

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 29

ggactagtga tcccactaac ggcccag

27

<210> 30

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 30

cgggatcctg ttgtatttag ttttttttgt tttgag

36

<210> 31

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 31

aaaaggatcc aaaaaaatgg tgagcaaggg cgaggag

37

<210> 32

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 32

ttttaagctt ttacttgtac agctcgtcca t

31

<210> 33

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 33

aaaaggatcc aaaaaaatgg ctcctccga ggacgtc

37

<210> 34

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 34

aaaaaagctt ctacaggaac aggtggtggc g

31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05956

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N1/19, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N1/19, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	VARELA, J.C. et al., The Saccharomyces cerevisiae HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A, Mol.Cell.Biol., 1995, Vol.15, No.11, pages 6232 to 6245	1-2, 5-8 /9-12
X/A	DE GROOT, E. et al., Very low amounts of glucose cause repression of the stress-responsive gene HSP12 in Saccharomyces cerevisiae, Microbiology, 2000, Vol.146, No.2, pages 367 to 375	1-2, 5-8 /9-12
P, X	SAHARA, T. et al., Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature, J Biol Chem, 2002 December, Vol.277, No.51, pages 50015 to 50021	1-2, 5-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
23 July, 2003 (23.07.03)

Date of mailing of the international search report
05 August, 2003 (05.08.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05956

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHANG, L. et al., Multiple mechanisms regulate expression of low temperature responsive (LOT) genes in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Biochem Biophys Res Commun</i> , 2001, Vol.283, No.2, pages 531 to 535	1-2,5-12
A	JP 8-9977 A (Kirin Brewery Co., Ltd.), 16 January, 1996 (16.01.96), (Family: none)	1-2,5-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05956

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
The parts relating to a DNA fragment in the upstream of the gene No.86 (YFLO14W) in claims 1 to 2 and 5 to 12.

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The technical feature common to the inventions as set forth in claims 1 to 12 is "a cold-inducible promoter". However, a cold-inducible promoter had been already well known as reported by JP8-9977A. Therefore, "a cold-inducible promoter" cannot be regarded as a special technical feature. Such being the case, it does not appear that there is a technical relationship among claims 1 to 12 and they are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

The technical feature common to claims 1 and 2 and the parts relating to claims 1 and 2 in claims 5 to 12 resides in "a DNA fragment occurring in the upstream of a *Saccharomyces cerevisiae* gene and having the function of a cold-inducible promoter". However, it had been already well known too as reported by JP 8-9977 A and thus "a DNA fragment occurring in the upstream of a *Saccharomyces cerevisiae* gene and having the function of a cold-inducible promoter" cannot be regarded as a special technical feature. Such being the case, it does not appear that there is a technical relationship among claims 1 and 2 and the parts relating to claims 1 and 2 in claims 5 to 12 and they are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept too.

Thus, the inventions as set forth in claims of the present application involve the following 261 groups of inventions:

the 259 inventions relating to DNA fragments occurring in the upstream of 259 *Saccharomyces cerevisiae* genes, i.e., No.1 (YAL014C) to No.259 (YPR200C) and having the function of a cold-inducible promoter as set forth in claims 1, 2 and 5 to 12;

the inventions relating to a cold-inducible promoter containing the DNA sequence A as set forth in claims 3, 4 and 5 to 12; and

the inventions relating to a cold-inducible promoter containing the DNA sequence B as set forth in claims 3, 4 and 5 to 12.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁷ C12N15/09, C12N1/19, C12P21/02		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁷ C12N15/09, C12N1/19, C12P21/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	VARELA, J.C. et al., The Saccharomyces cerevisiae HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A, Mol Cell Biol, 1995, Vol. 15, No. 11, p. 6232-6245	1-2, 5-8 /9-12
X/A	DE GROOT, E. et al., Very low amounts of glucose cause repression of the stress-responsive gene HSP12 in Saccharomyces cerevisiae, Microbiology, 2000, Vol. 146, No. 2, p. 367-375	1-2, 5-8 /9-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 23.07.03	国際調査報告の発送日 05.08.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 七條 里美 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 2936

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	SAHARA, T. et al., Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature, J Biol Chem, 2002 Dec, Vol. 277, No. 51, p. 50015-50021	1-2, 5-12
A	ZHANG, L. et al., Multiple mechanisms regulate expression of low temperature responsive (LOT) genes in Saccharomyces cerevisiae, Biochem Biophys Res Commun, 2001, Vol. 283, No. 2, p. 531-535	1-2, 5-12
A	JP 8-9977 A (麒麟麦酒株式会社) 1996. 01. 16 (ファミリーなし)	1-2, 5-12

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

(特別ページ) 参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲1-2, 5-12のうち番号86(YFL014W)遺伝子の上流のDNA断片に係る部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲1-12に記載される発明の共通する技術的特徴は、「低温誘導性プロモーター」である。しかし、低温誘導性プロモーターは、特開平8-9977号公報に記載されており、既に公知であるから、「低温誘導性プロモーター」は、特別な技術的特徴であるとは言えない。してみると、請求の範囲1-12は、特別な技術的特徴を含む技術的な関係にあるものとはいえず、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

また、請求の範囲1-2、及び、請求の範囲5-12のうち請求の範囲1-2に関連する部分における、共通する技術的特徴は、「サッカロミセス・セレビシエの遺伝子上流に存在する低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片」であるが、これについても、特開平8-9977号公報に記載されており、既に公知であるから、「サッカロミセス・セレビシエの遺伝子上流に存在する低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片」も、特別な技術的特徴であるとは言えない。してみると、請求の範囲1-2、及び、請求の範囲5-12のうち請求の範囲1-2に関連する部分も、特別な技術的特徴を含む技術的な関係にあるものとはいえず、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

したがって、本出願の請求の範囲に記載された発明には、請求の範囲1-2、5-12のうち、番号1(YAL014C)～番号259(YPR200C)までの259個のサッカロミセス・セレビシエの遺伝子上流に存在する低温誘導性プロモーターの機能を有するDNA断片に係る259発明、請求の範囲3-4、5-12のうち、DNA配列Aを含む低温誘導性プロモーターに係る発明、請求の範囲3-4、5-12のうち、DNA配列Bを含む低温誘導性プロモーターに係る発明の261発明が包含されている。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.